

## 明 細 書

## 遺伝子多型の検出方法

## 技 術 分 野

- 5 本発明は、ENAユニットを含むオリゴヌクレオチドを用いたPCRを利用した、遺伝子多型の検出方法、遺伝子多型の検出用のオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型検出用キットに関する。

## 背 景 技 術

- 10 ファーマコジェノミクス研究の進展により、遺伝子多型と薬効、あるいは遺伝子多型と副作用の関係から、個々の患者に対する薬物の効果や副作用を、遺伝子診断で予測することが可能になりつつある。このような例としては、薬物代謝酵素の遺伝子多型の例が挙げられる。多型により活性が増加、あるいは、減少する薬物代謝酵素としては、シトクロムP 4 5 0 1 A 2、シトクロムP 4 5 0 2 A 6、シトクロムP 4 5 0 2 C 9、シトクロムP 4 5 0 2 C 1 9、シトクロムP 4 5 0 2 D 6、シトクロムP 4 5 0 2 E 1などが知られている。また、チオプリンメチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、UDP-グルクウロノシルトランスフェラーゼ、および、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど抱合酵素と呼ばれる一群の酵素群にも遺伝子多型が存在し、多型により活性が減少することが報告されている（中村祐輔編、「SNP 遺伝子多型の戦略」、中山書店、2000 年6月5日）。

- また、遺伝子多型と疾患との関係を調べることにより、一部の疾患の事前診断や予後の判定も可能になりつつあり、多型解析研究から見出された疾患原因遺伝子が多数報告されている。例えば、潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてのHLA、慢性関節リウマチの原因遺伝子としてのTCR $\alpha$ 、アルツハイマー病の原因遺伝子としてのAPOE 4、精神分裂症 25 の原因遺伝子としてのドーパミンD 3受容体、躁鬱病の原因遺伝子としてのトリプトファン水酸化酵素、アルブミン尿症の原因遺伝子としてのアンジオテンシン前駆体、心筋梗塞の原因遺伝子としての血液凝固因子 VII、肥満の原因遺伝子としてのレプチンなどが報告されている（Nature Genetics、1999 年、第 22 巻、p.139-144）。

- 遺伝子多型の検出方法として、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法と制限 30 酵素による切断とを組み合わせたPCR-RFLP法（Science、1991 年、第 252 巻、

p.1643-)、配列の異なる一本鎖のDNAもしくはRNAはポリアクリルアミドゲル中で異なる移動度を示すという原理に基づいたSSCP (single-strand conformation polymorphism)法、または、オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端付近にミスマッチがあるとプライマーの伸長反応が阻止されるという原理に基づいたAS-PCR (allele-specific PCR)法などが開発されている。

PCR-RFLP法は、検査工程に3~24時間の制限酵素処理を含むために、迅速な方法とはいえない。SSCP法は検査対象となる塩基配列のどこかに、一個もしくは複数の変異が存在する場合に、その存在を高感度に検出できる点で優れている。しかし、微妙な移動度の差を検出するために実験条件を厳密にコントロールしなければならないので、非常に手間がかかる方法であり、かつ変異の位置を同定できない。また、実際の検体、たとえば血液や組織からSSCP法を行うには、クローニングやPCR法を用いて、事前に大量の核酸を調製する必要がある、多数の検体を効率よく検査するには適さない方法である。

AS-PCR法はPCRを応用した方法であり、事前に大量の核酸を調製する必要はなく、3'末端付近にミスマッチのないプライマーを使用したときのみ増幅産物が得られることを応用したもので、多数の検体を効率よく検査するために適した方法である。しかし、通常のPCRではプライマーにミスマッチが存在する場合でも増幅産物が得られる場合があり、厳密性に問題があった。

また、AS-PCR法を改変し、3'末端から2番目に対象遺伝子とは相補的ではない塩基を持つヌクレオシドを持ち、3'末端に検出したい多型部分を設定した場合、3'末端から2番目に対象遺伝子と相補的である塩基を持つヌクレオシドをもつプライマーに比べ、3'末端に存在する多型部位の検出が改善される報告がある (Bioorganic & Medical Chemistry, 2003年、第11巻、p.2211-2226)。しかし、この方法を用いた場合でもプライマーの3'末端にミスマッチが存在しても増幅産物が得られることがあり、より検出感度の高い遺伝子多型の検出方法の開発が求められていた。

2'-O,4'-G-エチレンヌクレオチド (以下、「ENAヌクレオチド」ともいう。)は非天然型のヌクレオチドである。ENAヌクレオチドを導入したオリゴヌクレオチドは、相補鎖RNAに対して高い結合能を有している (日本国特許第3420984号公報 (日本国公開特許公報 特開平12-297097) 及びBioorganic & Medical Chemistry, 2003年、第11巻、p.2211-2226。)。また、ENAヌクレオチドは糖部の2'位酸素原子と4'位炭素原子を

- メチレン鎖で架橋したヌクレオチドである LNA ヌクレオチド (2'-O,4'-O-メチレンヌクレオチド (日本国公開特許公報 特開平 10-304889 号) よりもヌクレアーゼに対して高い抵抗性を有するという特徴を持っている (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002 年、第 12 巻、p. 73-76)。しかしながら、ENA ヌクレオチドをプライマーとして用いることによって AS-PCR の測定精度を向上させることができるか否かは不明であった。

- 本発明者らは、上記 多型の検出方法の問題点を解決すべく、検討を行ったところ、多型部位を 3' 末端にし、さらに 3' 末端から 3 番目に ENA 修飾が加えられたオリゴヌクレオチドを PCR プライマーとして用いた場合、ミスマッチによる増幅産物の生成量が減少し、精度が高く遺伝子多型が検出できることを見出し、更に該検出方法に用いることができるキットを提供した。

- 更に本発明者らは、多型部位を 3' 末端にし、3' 末端から 2 番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、3' 末端から 3 番目に ENA 修飾が加えられたオリゴヌクレオチドを PCR プライマーとして用いた場合、ミスマッチによる増幅産物の生成量が減少し、精度が高く遺伝子多型が検出できることを見出し、更に該検出方法に用いることができるキットを提供し、本発明を完成させた。

## 発 明 の 開 示

- 本発明の課題は、遺伝子多型を検出する方法及び該方法に使用することができるオリゴヌクレオチドを提供し、さらに、該オリゴヌクレオチドを含む遺伝子多型検出用キットを提供することである。

- 本発明は鋳型となる核酸のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなる合成オリゴヌクレオチドプライマーを合成する際に、合成オリゴヌクレオチドプライマーの 3' 末端のヌクレオチドを鋳型のヌクレオチドと相補的ではないヌクレオチドにすると DNA ポリメラーゼによるプライマーの伸張反応が起こらず、鋳型となる核酸のヌクレオチド配列と完全に相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた場合には DNA ポリメラーゼによるプライマーの伸張反応が起きる現象を利用した遺伝子多型の検出方法に関する。

- さらに詳しくは、本発明は、合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列の 3' 末端を多型部位にし、さらに 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドとして 2'-O,4'-O-エチレンヌ

クレオチド (ENA) ユニットを用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることを特徴とする遺伝子多型の検出方法に関する。

- さらに本発明は、合成オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列の 3' 末端を多型部位にし、3' 末端から 2 番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、3' 末端から 3 番目のヌクレオチドとして 2' -0,4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットを用いたオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることを特徴とする遺伝子多型の検出方法に関する。

本発明の課題を解決手段としては具体的には

- (1) 以下の (a) 及び (b) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
- 10 (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；
- (b) 3' 末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、
- 15 (2) 以下の (a) 及び (b) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
- (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；
- (b) 3' 末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の
- 20 部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、
- (3) 以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
- (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；
- (b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目と
- 25 して 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；
- (c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；
- (d) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、
- 30

(4) 以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

(a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

5 (b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

10 (d) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' - $\epsilon$ -エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(5) 18 乃至 25 塩基長からなることを特徴とする、(1) 乃至 (4) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩、

(6) (1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型の検出方法、

15 (7) (1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法、

(8) 以下の工程 (a) 及び (b) を含む、遺伝子多型の検出方法：

20 (a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、(1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になって PCR で目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行う工程；

(b) 工程 (a) によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型の有無を判定する工程、

(9) 以下の工程 (a) 及び (b) を含む、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法：

25 (a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、(1) 乃至 (5) のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になって PCR で目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いて PCR を行う工程；

(b) 工程 (a) によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型部位のヌクレオチド配列を決定する工程、

30 (10) 反応産物の生成の有無の検出に、電気泳動、TaqMan PCR 及び MALDI

ーTOF/MS法からなる群から選択される少なくともいずれか一つを用いることを特徴とする(8)又は(9)に記載の方法、

(11) 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、(6)乃至(10)のいずれか1項に記載の方法、

5 (12) 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリ  
10 ゴヌクレオチド；

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリ  
ゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液、

15 (13) 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリ  
20 ゴヌクレオチド；

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液、

25 (14) 以下の(a)乃至(e)を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリ  
30 ゴヌクレオチド；

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-*G*-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド;

5

(c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

(d) DNAポリメラーゼ;

(e) PCR緩衝液、

10 (15) 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩:

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

15

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

20

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-*G*-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

(c) DNAポリメラーゼ;

25

(d) PCR緩衝液、

(16) 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

30

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目

として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

5 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-G-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド;

10 (c) DNAポリメラーゼ;

(d) PCR緩衝液;

(17) 以下の(a)乃至(e)を含む、遺伝子多型検出用キット:

(a) 以下の(i)乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

15 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

20 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する;

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-G-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる;

(b) (i) 乃至(iv)の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩;

25 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる;

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる;

30 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有す



る；

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

5 (c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液、

10 (18) オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチドの塩基長が18乃至25塩基長であることを特徴とする、

(12) 乃至 (17) のいずれか1項に記載の遺伝子多型検出用キット、

(19) 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、(12) 乃至 (18) のいずれか1項に記載のキット、  
からなる。

15 本発明における、遺伝子多型の検出方法の1つの原理は以下の通りである。

(1) 遺伝子多型を検出したい配列(目的配列)の多型部分にプライマーの3'末端を設定し、かつプライマーの3'末端から3番目に2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットの修飾を加える。このプライマーと遺伝子多型検出対象のヌクレオチド配列を含む核酸を反応液中で核酸合成酵素の混合物と作用させると、プライマーの3'末端が一致  
20 する(塩基が相補的である)場合は、核酸合成反応が起こる。これに対して、3'末端が一致しない場合は、核酸合成反応が起こらない。このように3'末端が一致する場合は核酸合成反応が起こり、一致しない場合は核酸合成反応が起こらない違いを利用して、ヌクレオチド配列の変異を検出することができる。この原理を図1と図2で説明する。

図1は、核酸配列に変異(多型)がない場合を示す。(i)は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鋳型核酸で、塩基配列の一部に3'-ATGC-5'の配列をもつ。この鋳型核酸と3'末端から3番目にENA修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(ii)(2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットのeTと表記する)とがアニーリングして2本鎖を形成する。この場合、(ii)の塩基配列の内少なくとも3'末端は対応するの塩基と相補な構成になっており、(ii)と(i)とは2本鎖を形成する。この2本鎖を形成しているオリゴヌク  
30 レオチド(ii)の3'末端の部分を核酸合成酵素(iii)が認識し、核酸合成反応が進行する。

ここに示した具体的な塩基配列は説明のためのものであり、この塩基配列のみに有効であることを意味するものではない。

図2は核酸配列に変異(多型)がある場合を示す。(i)は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鋳型核酸で、塩基配列の一部に3'-ATAC-5'の配列をもつ。この鋳型核酸と  
5 3'末端から3番目にENA修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(ii)(2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットをeTと表記する)とがアニーリングして2本鎖を形成する。この場合、(ii)の塩基配列の内少なくとも3'末端は対応する塩基と相補な構成になっておらず、(ii)の3'末端のCが(i)内のAとワトソン-クリック塩基対を形成していない。このワトソン-クリック塩基対を形成していないオリゴヌクレオチド(ii)の3'末  
10 端の部分を核酸合成酵素(iii)が認識できず、核酸合成反応が進行することができない。ここに示した具体的な塩基配列は説明のためのものであり、この塩基配列のみに有効であることを意味するものではない。

本発明における、遺伝子多型の検出方法の他の1つの原理は以下の通りである。

(2) 遺伝子多型を検出したい配列(目的配列)の多型部分にプライマーの3'末端を  
15 設定し、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではない塩基を持つヌクレオチドにし、かつプライマーの3'末端から3番目にENAユニットの修飾を加える。このプライマーと遺伝子多型検出対象のヌクレオチド配列を含む核酸及び該プライマーと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを反応液中で核酸合成酵素の混合物と作用させると、プライマーの3'末端が一致する(塩基が相補的  
20 ある)場合は、核酸合成反応が起こり、遺伝子が増幅される。これに対して、3'末端が一致しない場合は、核酸合成反応が起こらず、遺伝子の増幅は見られない。このように3'末端の塩基が相補する場合は核酸合成反応が起こり、相補しない場合は核酸合成反応が起こらない違いを利用して、ヌクレオチド配列の変異を検出することができる。この原理を図3と図4で説明する。

25 図3は、核酸配列に変異(多型)がない場合を示す。(i)は核酸配列の変異(多型)を調べようとする対象の鋳型核酸で、塩基配列の一部に3'-ATGC-5'の配列をもつ。(ii)はプライマーである。このプライマーでは、3'末端から2番目のヌクレオチドを検出対象の遺伝子と相補的ではないヌクレオチドにし(図ではグアニン(G)。)、それ以外のヌクレオチドは検出対象の遺伝子と相補的なヌクレオチドである。また、3'末端から3番目はENA  
30 修飾が加えられたオリゴヌクレオチド(2'-0,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン ユニッ

トを eT と表記する) にしている。この場合、(ii) のヌクレオチド配列のうち 3' 末端から 2 番目以外のヌクレオチド配列は対応する (i) のヌクレオチド配列と相補な配列になっており、(ii) のヌクレオチド配列のうち 3' 末端から 2 番目でミスマッチするものの、鋳型核酸と多型検出用プライマーがアニーリングして 2 本鎖を形成する。この相補鎖を形成しているオリゴヌクレオチド(ii) の 3' 末端の部分を核酸合成酵素(iii) が認識し、核酸合成反応が進行する。

なお、ここに示した具体的なヌクレオチド配列は説明のための例示に過ぎず、本発明が、このヌクレオチド配列のみに有効であることを意味するものではない。

図 4 はヌクレオチド配列に変異(多型)がある場合を示す。(i) はヌクレオチド配列の変異(多型)を調べようとする対象の鋳型核酸で、ヌクレオチド配列の一部に 3' -ATAC-5' の配列をもつ。(ii) はプライマーである。このプライマーでは、3' 末端及び 3' 末端から 2 番目のヌクレオシドを検出対象の遺伝子と相補的ではないヌクレオシドにし(図ではグアニン(G)。)、それ以外のヌクレオシドは検出対象の遺伝子と相補的なヌクレオシドである。また、3' 末端から 3 番目は ENA 修飾が加えられたオリゴヌクレオチド (2' -0,4' -C-エチレン-5-メチルウリジン ユニットを eT と表記する) にしている。この場合、(ii) のヌクレオチド配列のうち、3' 末端及び 3' 末端から 2 番目のヌクレオシドは対応するヌクレオシドと相補なヌクレオシドになっておらず、(ii) の 3' 末端部分がワトソン-クリック塩基対を形成しない。このワトソン-クリック塩基対を形成していないオリゴヌクレオチド(ii) の 3' 末端の部分を核酸合成酵素(iii) が認識できず、核酸合成反応は進まない。

なお、ここに示した具体的なヌクレオチド配列は説明のための例示に過ぎず、本発明が、このヌクレオチド配列のみに有効であることを意味するものではない。

本発明により、新規な遺伝子多型の検出方法が提供された。本発明の遺伝子多型の検出方法を用いることにより、天然型のオリゴヌクレオチドを用いる場合に比べより正確に多型を検出できるようになった。

また、該方法に用いることができる、遺伝子多型の検出用オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型の検出用キットも提供された。

## 1. 用語の説明

本明細書中において「遺伝子多型」とは、ある遺伝子座において、(a) 1 個の塩基が他

の塩基に置き換わっているもの（一塩基多型（SNP））及び／又は（b）1から数十塩基（数千塩基のこともある）が欠失や挿入をしているもの（挿入／欠失多型）を意味する。本明細書において、一塩基多型とはSNP (single nucleotide polymorphism) ともいい、個人間におけるヌクレオチド配列中の一塩基の違いをいう。

- 5 一塩基多型部分のヌクレオチドとしては2種類のヌクレオチドの変異が存在することが知られており（例えば、アデニンかグアニン、チミンかシトシン等）、その変異の割合は対象となる遺伝子によって異なっている。本明細書中において、「対象遺伝子」とは、遺伝子多型を検出する対象とする遺伝子のことをいう。

- 10 本明細書においては、対象遺伝子の一塩基多型部位の2種類の塩基の変異のうちで出現頻度の高いヌクレオチドを含む配列を基準配列とし、基準配列中の一塩基多型部位のヌクレオチドを基準ヌクレオチドとし、出現頻度の低いヌクレオチドを含む配列を変異配列とし、変異配列中の一塩基多型部位のヌクレオチドを変異ヌクレオチドとする。

また、多型が欠失多型の場合には欠失がない配列を基準配列とし、欠失がある配列を変異配列とする。

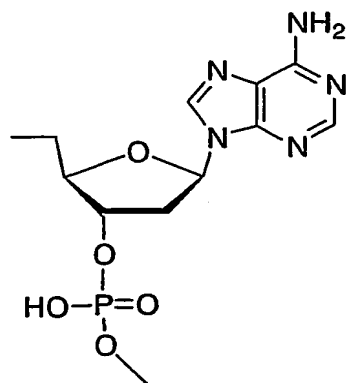
- 15 さらに、多型が挿入多型の場合には挿入がない配列を基準配列とし、挿入がある配列を変異配列とする。

また、本明細書中において、「多型を有する」とは、対象遺伝子の目的とする多型を含む配列が変異配列を有することを意味し、「多型を有さない」とは対象遺伝子の目的とする多型を含む配列が基準配列であることを意味する。

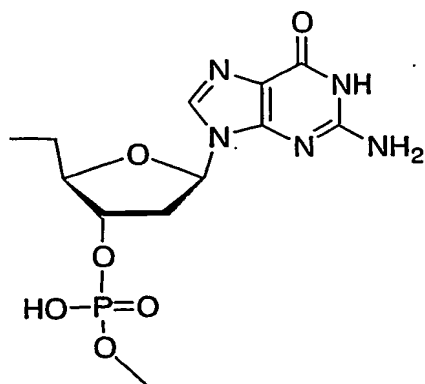
- 20 本明細書中において、「天然型のヌクレオチド」とは、アデニンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、チミンヌクレオチドをいう。また、「天然型のオリゴヌクレオチド」とは、アデニンヌクレオチド、グアニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチド、ウラシルヌクレオチド、チミンヌクレオチド等の天然型ヌクレオチドから構成されるオリゴヌクレオチドのことを示す。

- 25 本明細書においてはアデニンヌクレオチドをA<sup>p</sup>、グアニンヌクレオチドをG<sup>p</sup>、シトシンヌクレオチドをC<sup>p</sup>及びチミンヌクレオチドをT<sup>p</sup>と表記することもある。また天然型のオリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオシド、アデニンヌクレオシドはA<sup>t</sup>、グアニンヌクレオシドはG<sup>t</sup>、シトシンヌクレオシドはC<sup>t</sup>及びチミンヌクレオシドはT<sup>t</sup>と表わすことができる。

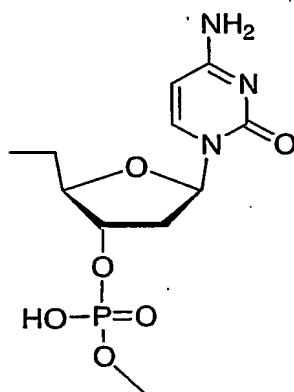
- 30 天然型のヌクレオチドの構造式を以下に示す。



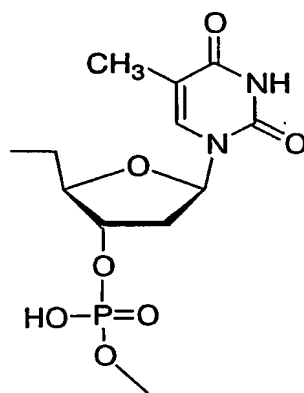
**A<sup>P</sup>**



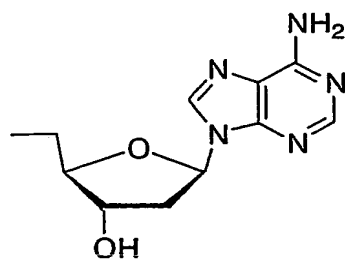
**G<sup>P</sup>**



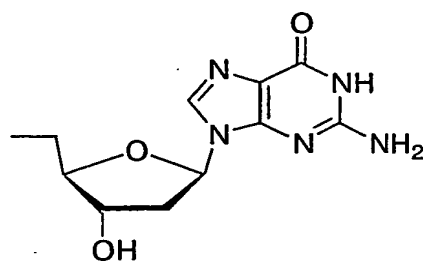
**C<sup>P</sup>**



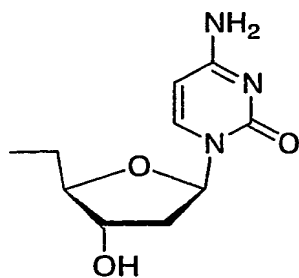
**T<sup>P</sup>**



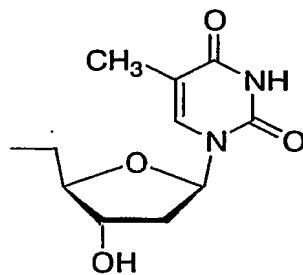
**A<sup>t</sup>**



**G<sup>t</sup>**



**C<sup>t</sup>**

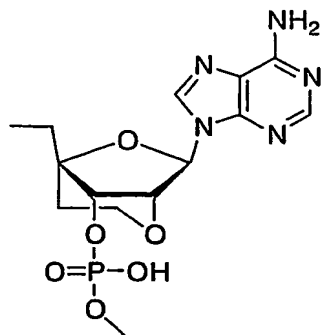
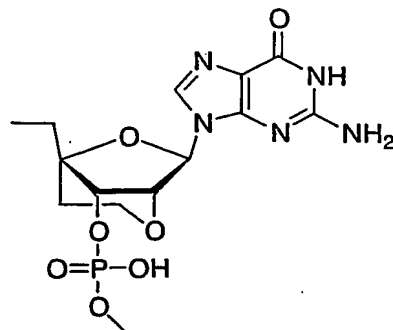
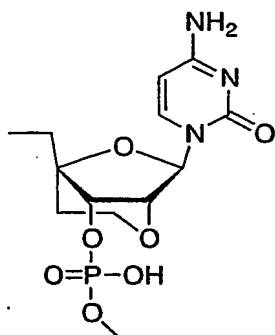
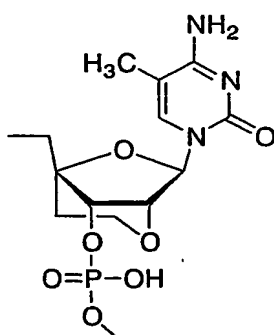
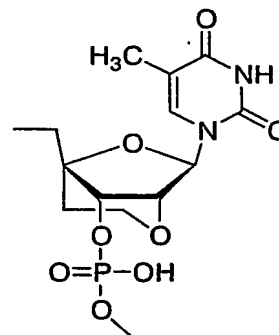
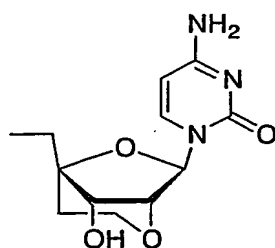
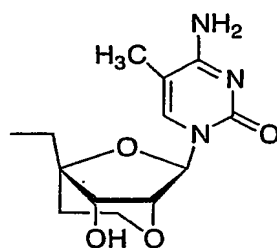
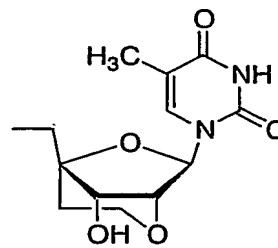
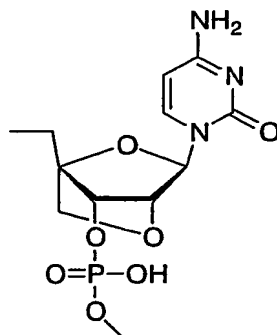


**T<sup>t</sup>**

本明細書中において、「ENAヌクレオチド」（以下、「ENA」ともいう。）とは、糖部の2'位酸素原子と4'位炭素原子をエチレン鎖で架橋したヌクレオチドである（特許第3420984号参照。）。

- 5 本明細書において 2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド ユニット及び「ENAユニット」とは  $A^{e2p}$ 、 $G^{e2p}$ 、 $C^{e2p}$ 、 $5C^{e2p}$ 、 $T^{e2p}$ 、または、オリゴヌクレオチドの3'末端に有する場合、ENAをヌクレオシドとして扱う場合は、 $C^{e2t}$ 、 $5C^{e2t}$ 、 $T^{e2t}$ 、から選択されるいずれかの基を意味し、その構造は下記に示すとおりである。またLNAユニットとして  $C^{e1p}$  の構造も示す。

10

**A<sup>e2p</sup>****G<sup>e2p</sup>****C<sup>e2p</sup>****5C<sup>e2p</sup>****T<sup>e2p</sup>****C<sup>e2t</sup>****5C<sup>e2t</sup>****T<sup>e2t</sup>****C<sup>e1p</sup>**

本明細書中における、「相補的なヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの塩基部分が相補するヌクレオチドのことをいい、具体的には、塩基部分がアデニンとチミン、グアニンとシトシン及びアデニンとウラシルであるヌクレオチドが互いに相補的なヌクレオチドである。

- 5 本明細書中における、「その塩」とは、本発明の化合物は、塩にすることができるので、その塩をいい、そのような塩としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N, N'*-ジベンジリエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩等の
- 10 アミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。
- 15
- 20

なお、本発明の化合物及びその塩は、水和物としても存在することができ、本発明は、それらの水和物をも包含する。

## 25 2. 検体

本発明で遺伝子多型を検出する対象となる検体としては、核酸を含む試料を用いることができる。核酸としては一例として、ゲノムDNAを挙げることができるが、これに限定されない。

- 例えば、ヒトの遺伝子の多型を検出するためにはヒトゲノムDNAを含む検体を用いる
- 30 ことができ、マウスの遺伝子の多型を検出するためには、マウスゲノムDNAを用いること



ができる。ゲノムDNAは当業者に公知の方法で取得することができる。以下、ヒトのゲノムDNAを例にして説明するが、他の生物由来のゲノムDNAも同様に取得することができる。

5 ゲノムDNAを得るための材料としては、被験者から採取されたあらゆる細胞（生殖細胞を除く）、組織、臓器等を使用することができるが、好ましくは末梢血から分離した白血球または単核球であり、最も好適には白血球である。これらの材料は、臨床検査において通常用いられる方法によって採取され得る。

例えば白血球を用いる場合、まず被験者より採取した末梢血から周知の方法で白血球を分離する。次いで、得られた白血球にプロテイナーゼKとドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を加えてタンパク質を分解、変性させた後、フェノール/クロロホルム抽出を行うことによりゲノムDNA（RNAを含む）を得る。RNAは、必要に応じRNaseにより除去することができる。ただし、本発明はこれに限定されず、ヒトゲノムDNAを含む試料からのゲノムDNAの抽出にあたっては、本発明の技術分野において周知の方法、すな  
10 わち文献（例えば、Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.)" Cold Spring Harbor Laboratory, NY 参照）に記載されている方法や、市販のDNA抽出キット等を利用する方法も好ましく用いることができる。

DNAを含む検体は、PCRに用いることができる限度においてその純度は問わず、試料よりの粗抽出物、精製物等を用いることができる。

### 20 3. 対象遺伝子の選択

遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子は、少なくとも一部のヌクレオチド配列が既に知られており、その部分に多型が存在するものであればいずれでもよい。そのような遺伝子の一例として、薬効や薬の副作用に関与する薬物代謝遺伝子である、シトクロムP4501A2、シトクロムP4502A6、シトクロムP4502C9、シトクロムP4502C  
25 19、シトクロムP4502D6、シトクロムP4502E1などが知られている。また、チオプリンメチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、UDP-グルクウロノシルトランスフェラーゼ、および、グルタチオンS-トランスフェラーゼや、疾患との関連遺伝子として、潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてのHLA、慢性関節リウマチの原因遺伝子としてのTCR $\alpha$ 、アルツハイマー病の原因遺伝子としてのAPOE4、精神  
30 分裂症の原因遺伝子としてのドーパミンD3受容体、躁鬱病の原因遺伝子としてのトリプ

トファン水酸化酵素、アルブミン尿症の原因遺伝子としてのアンジオテンシン前駆体、心筋梗塞の原因遺伝子としての血液凝固因子 VII 及び肥満の原因遺伝子としてのレプチンなどを挙げることができる。その他 human prothrombin 等を挙げることができる。

- また、マウスのゲノムDNAを検体として用いる場合にはマウスのアンジオポエチン関連 3 (Angiopietin-like 3) 遺伝子のプロモーター上の多型及び、欠失多型も挙げることができる。

なお、遺伝子中の多型の位置は翻訳領域、非翻訳領域、プロモーター、イントロン等の調節領域及びその他の領域のいずれであってもよい。

#### 10 4. オリゴヌクレオチドプライマー

以下のオリゴヌクレオチドは、核酸自動合成機を用いて合成することができる。

- 天然のオリゴヌクレオチドについては天然のホスホロアミダイトを使用して合成することができる。2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチドについては特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン  
15 -3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例 27 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例 5 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイルシチジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソ  
20 プロピル)ホスホロアミダイト)、実施例 22 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例 9 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト) に記載の化合物を用いることによって合成することができる。

##### (1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド

- 25 (1) -1 本発明で用いる遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとしては、以下の (a) 及び (b) を挙げることができる。

##### (a) 基準配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド：

以下の(i)乃至(iii)の特徴を有する；

- (i)オリゴヌクレオチドの3' 末端から3 番目(3' 末端のヌクレオチドを1 番目として3  
30 番目)のヌクレオチドが2' -O, 4' -C-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、

他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(ii) 3' 末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、

- (iii) オリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチドの長さは PCR によって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは 15～40 ヌクレオチド、より好ましくは 18～35 ヌクレオチド、更に好ましくは 18～25 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「X-PRIMER」と呼ぶことにする。

- 10 (b) 変異配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

- (ii) 3' 末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する、

(iii) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さは PCR によって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは 15～40 ヌクレオチド、より好ましくは 18～35 ヌクレオチド、更に好ましくは 18～25 ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

- 20 上記 (a) 及び (b) 中の (i) において、オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -O, 4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットであるとは、3 番目のヌクレオチドを天然型のヌクレオチドではなく、ENA ヌクレオチドであることをすることを意味する。例えば、A<sup>p</sup>の代わりに A<sup>e2p</sup>、G<sup>p</sup>の代わりに G<sup>e2p</sup>、C<sup>p</sup>の代わりに 5 C<sup>e2p</sup> または C<sup>e2p</sup>、T<sup>p</sup>の代わりに T<sup>e2p</sup>を用いることを意味する。

- 25 このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「Y-PRIMER」と呼ぶことにする。

(1) -2 本発明で用いる遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとしては、更に以下の (c) 及び (d) を挙げることができる。

- (c) 3' 末端部位から 2 番目のヌクレオチド以外が基準配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

以下の(i)乃至(v)の特徴を有する；

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

5 (ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、

10 他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15~40ヌクレオチド、より好ましくは18~35ヌクレオチド、更に好ましくは18~25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

15 このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「N-PRIMER」と呼ぶことにする。

(d) 3'末端部位から2番目のヌクレオチド以外が変異配列に相補的なヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチド

以下の(i)乃至(v)の特徴を有する；

20 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

25 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

(v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15~40ヌクレオチド、より好ましくは18~35ヌクレオチド、更に好ましくは18~25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

30

このような特徴を有するオリゴヌクレオチドを、以下、「P-PRIMER」と呼ぶことにする。

上記 (a) 乃至 (d) 中の (iv) において、オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットであるとは、3 番目のヌクレオチドが天然型のヌクレオチドではなく、ENAヌクレオチドであることを意味する。例えば、A<sup>p</sup>の代わりにA<sup>e2p</sup>、G<sup>p</sup>の代わりにG<sup>e2p</sup>、C<sup>p</sup>の代わりに5 C<sup>e2p</sup>またはC<sup>e2p</sup>、T<sup>p</sup>の代わりにT<sup>e2p</sup>が用いられることを意味する。

なお、これらの (a) 乃至 (d) のオリゴヌクレオチドをPCR用フォワード・プライマー (Forward primer) と呼ぶこともある。

10 (2) 対になって用いられるオリゴヌクレオチド

(a) PCR用オリゴヌクレオチド

PCRにおいて上記 (1) に記載の (a) 乃至 (d) のいずれかのオリゴヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子のヌクレオチド配列において、上記 (1) の (a) 乃至 (d) のいずれかの遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になってPCRによって対象の遺伝子中の目的の配列を増幅できる限りにおいて特に制限されないが、具体的には相補鎖にあたる配列中の最も 5' 末端側の位置よりもさらに 5' 末端側領域に存在する相補鎖の配列中の連続した 15~40ヌクレオチド、好ましくは 18乃至35ヌクレオチド、更に好ましくは 18乃至25ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、遺伝子多型検出用のオリ  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 70  
 75  
 80  
 85  
 90  
 95  
 100  
 105  
 110  
 115  
 120  
 125  
 130  
 135  
 140  
 145  
 150  
 155  
 160  
 165  
 170  
 175  
 180  
 185  
 190  
 195  
 200  
 205  
 210  
 215  
 220  
 225  
 230  
 235  
 240  
 245  
 250  
 255  
 260  
 265  
 270  
 275  
 280  
 285  
 290  
 295  
 300  
 305  
 310  
 315  
 320  
 325  
 330  
 335  
 340  
 345  
 350  
 355  
 360  
 365  
 370  
 375  
 380  
 385  
 390  
 395  
 400  
 405  
 410  
 415  
 420  
 425  
 430  
 435  
 440  
 445  
 450  
 455  
 460  
 465  
 470  
 475  
 480  
 485  
 490  
 495  
 500  
 505  
 510  
 515  
 520  
 525  
 530  
 535  
 540  
 545  
 550  
 555  
 560  
 565  
 570  
 575  
 580  
 585  
 590  
 595  
 600  
 605  
 610  
 615  
 620  
 625  
 630  
 635  
 640  
 645  
 650  
 655  
 660  
 665  
 670  
 675  
 680  
 685  
 690  
 695  
 700  
 705  
 710  
 715  
 720  
 725  
 730  
 735  
 740  
 745  
 750  
 755  
 760  
 765  
 770  
 775  
 780  
 785  
 790  
 795  
 800  
 805  
 810  
 815  
 820  
 825  
 830  
 835  
 840  
 845  
 850  
 855  
 860  
 865  
 870  
 875  
 880  
 885  
 890  
 895  
 900  
 905  
 910  
 915  
 920  
 925  
 930  
 935  
 940  
 945  
 950  
 955  
 960  
 965  
 970  
 975  
 980  
 985  
 990  
 995  
 1000  
 1005  
 1010  
 1015  
 1020  
 1025  
 1030  
 1035  
 1040  
 1045  
 1050  
 1055  
 1060  
 1065  
 1070  
 1075  
 1080  
 1085  
 1090  
 1095  
 1100  
 1105  
 1110  
 1115  
 1120  
 1125  
 1130  
 1135  
 1140  
 1145  
 1150  
 1155  
 1160  
 1165  
 1170  
 1175  
 1180  
 1185  
 1190  
 1195  
 1200  
 1205  
 1210  
 1215  
 1220  
 1225  
 1230  
 1235  
 1240  
 1245  
 1250  
 1255  
 1260  
 1265  
 1270  
 1275  
 1280  
 1285  
 1290  
 1295  
 1300  
 1305  
 1310  
 1315  
 1320  
 1325  
 1330  
 1335  
 1340  
 1345  
 1350  
 1355  
 1360  
 1365  
 1370  
 1375  
 1380  
 1385  
 1390  
 1395  
 1400  
 1405  
 1410  
 1415  
 1420  
 1425  
 1430  
 1435  
 1440  
 1445  
 1450  
 1455  
 1460  
 1465  
 1470  
 1475  
 1480  
 1485  
 1490  
 1495  
 1500  
 1505  
 1510  
 1515  
 1520  
 1525  
 1530  
 1535  
 1540  
 1545  
 1550  
 1555  
 1560  
 1565  
 1570  
 1575  
 1580  
 1585  
 1590  
 1595  
 1600  
 1605  
 1610  
 1615  
 1620  
 1625  
 1630  
 1635  
 1640  
 1645  
 1650  
 1655  
 1660  
 1665  
 1670  
 1675  
 1680  
 1685  
 1690  
 1695  
 1700  
 1705  
 1710  
 1715  
 1720  
 1725  
 1730  
 1735  
 1740  
 1745  
 1750  
 1755  
 1760  
 1765  
 1770  
 1775  
 1780  
 1785  
 1790  
 1795  
 1800  
 1805  
 1810  
 1815  
 1820  
 1825  
 1830  
 1835  
 1840  
 1845  
 1850  
 1855  
 1860  
 1865  
 1870  
 1875  
 1880  
 1885  
 1890  
 1895  
 1900  
 1905  
 1910  
 1915  
 1920  
 1925  
 1930  
 1935  
 1940  
 1945  
 1950  
 1955  
 1960  
 1965  
 1970  
 1975  
 1980  
 1985  
 1990  
 1995  
 2000  
 2005  
 2010  
 2015  
 2020  
 2025  
 2030  
 2035  
 2040  
 2045  
 2050  
 2055  
 2060  
 2065  
 2070  
 2075  
 2080  
 2085  
 2090  
 2095  
 2100  
 2105  
 2110  
 2115  
 2120  
 2125  
 2130  
 2135  
 2140  
 2145  
 2150  
 2155  
 2160  
 2165  
 2170  
 2175  
 2180  
 2185  
 2190  
 2195  
 2200  
 2205  
 2210  
 2215  
 2220  
 2225  
 2230  
 2235  
 2240  
 2245  
 2250  
 2255  
 2260  
 2265  
 2270  
 2275  
 2280  
 2285  
 2290  
 2295  
 2300  
 2305  
 2310  
 2315  
 2320  
 2325  
 2330  
 2335  
 2340  
 2345  
 2350  
 2355  
 2360  
 2365  
 2370  
 2375  
 2380  
 2385  
 2390  
 2395  
 2400  
 2405  
 2410  
 2415  
 2420  
 2425  
 2430  
 2435  
 2440  
 2445  
 2450  
 2455  
 2460  
 2465  
 2470  
 2475  
 2480  
 2485  
 2490  
 2495  
 2500  
 2505  
 2510  
 2515  
 2520  
 2525  
 2530  
 2535  
 2540  
 2545  
 2550  
 2555  
 2560  
 2565  
 2570  
 2575  
 2580  
 2585  
 2590  
 2595  
 2600  
 2605  
 2610  
 2615  
 2620  
 2625  
 2630  
 2635  
 2640  
 2645  
 2650  
 2655  
 2660  
 2665  
 2670  
 2675  
 2680  
 2685  
 2690  
 2695  
 2700  
 2705  
 2710  
 2715  
 2720  
 2725  
 2730  
 2735  
 2740  
 2745  
 2750  
 2755  
 2760  
 2765  
 2770  
 2775  
 2780  
 2785  
 2790  
 2795  
 2800  
 2805  
 2810  
 2815  
 2820  
 2825  
 2830  
 2835  
 2840  
 2845  
 2850  
 2855  
 2860  
 2865  
 2870  
 2875  
 2880  
 2885  
 2890  
 2895  
 2900  
 2905  
 2910  
 2915  
 2920  
 2925  
 2930  
 2935  
 2940  
 2945  
 2950  
 2955  
 2960  
 2965  
 2970  
 2975  
 2980  
 2985  
 2990  
 2995  
 3000  
 3005  
 3010  
 3015  
 3020  
 3025  
 3030  
 3035  
 3040  
 3045  
 3050  
 3055  
 3060  
 3065  
 3070  
 3075  
 3080  
 3085  
 3090  
 3095  
 3100  
 3105  
 3110  
 3115  
 3120  
 3125  
 3130  
 3135  
 3140  
 3145  
 3150  
 3155  
 3160  
 3165  
 3170  
 3175  
 3180  
 3185  
 3190  
 3195  
 3200  
 3205  
 3210  
 3215  
 3220  
 3225  
 3230  
 3235  
 3240  
 3245  
 3250  
 3255  
 3260  
 3265  
 3270  
 3275  
 3280  
 3285  
 3290  
 3295  
 3300  
 3305  
 3310  
 3315  
 3320  
 3325  
 3330  
 3335  
 3340  
 3345  
 3350  
 3355  
 3360  
 3365  
 3370  
 3375  
 3380  
 3385  
 3390  
 3395  
 3400  
 3405  
 3410  
 3415  
 3420  
 3425  
 3430  
 3435  
 3440  
 3445  
 3450  
 3455  
 3460  
 3465  
 3470  
 3475  
 3480  
 3485  
 3490  
 3495  
 3500  
 3505  
 3510  
 3515  
 3520  
 3525  
 3530  
 3535  
 3540  
 3545  
 3550  
 3555  
 3560  
 3565  
 3570  
 3575  
 3580  
 3585  
 3590  
 3595  
 3600  
 3605  
 3610  
 3615  
 3620  
 3625  
 3630  
 3635  
 3640  
 3645  
 3650  
 3655  
 3660  
 3665  
 3670  
 3675  
 3680  
 3685  
 3690  
 3695  
 3700  
 3705  
 3710  
 3715  
 3720  
 3725  
 3730  
 3735  
 3740  
 3745  
 3750  
 3755  
 3760  
 3765  
 3770  
 3775  
 3780  
 3785  
 3790  
 3795  
 3800  
 3805  
 3810  
 3815  
 3820  
 3825  
 3830  
 3835  
 3840  
 3845  
 3850  
 3855  
 3860  
 3865  
 3870  
 3875  
 3880  
 3885  
 3890  
 3895  
 3900  
 3905  
 3910  
 3915  
 3920  
 3925  
 3930  
 3935  
 3940  
 3945  
 3950  
 3955  
 3960  
 3965  
 3970  
 3975  
 3980  
 3985  
 3990  
 3995  
 4000  
 4005  
 4010  
 4015  
 4020  
 4025  
 4030  
 4035  
 4040  
 4045  
 4050  
 4055  
 4060  
 4065  
 4070  
 4075  
 4080  
 4085  
 4090  
 4095  
 4100  
 4105  
 4110  
 4115  
 4120  
 4125  
 4130  
 4135  
 4140  
 4145  
 4150  
 4155  
 4160  
 4165  
 4170  
 4175  
 4180  
 4185  
 4190  
 4195  
 4200  
 4205  
 4210  
 4215  
 4220  
 4225  
 4230  
 4235  
 4240  
 4245  
 4250  
 4255  
 4260  
 4265  
 4270  
 4275  
 4280  
 4285  
 4290  
 4295  
 4300  
 4305  
 4310  
 4315  
 4320  
 4325  
 4330  
 4335  
 4340  
 4345  
 4350  
 4355  
 4360  
 4365  
 4370  
 4375  
 4380  
 4385  
 4390  
 4395  
 4400  
 4405  
 4410  
 4415  
 4420  
 4425  
 4430  
 4435  
 4440  
 4445  
 4450  
 4455  
 4460  
 4465  
 4470  
 4475  
 4480  
 4485  
 4490  
 4495  
 4500  
 4505  
 4510  
 4515  
 4520  
 4525  
 4530  
 4535  
 4540  
 4545  
 4550  
 4555  
 4560  
 4565  
 4570  
 4575  
 4580  
 4585  
 4590  
 4595  
 4600  
 4605  
 4610  
 4615  
 4620  
 4625  
 4630  
 4635  
 4640  
 4645  
 4650  
 4655  
 4660  
 4665  
 4670  
 4675  
 4680  
 4685  
 4690  
 4695  
 4700  
 4705  
 4710  
 4715  
 4720  
 4725  
 4730  
 4735  
 4740  
 4745  
 4750  
 4755  
 4760  
 4765  
 4770  
 4775  
 4780  
 4785  
 4790  
 4795  
 4800  
 4805  
 4810  
 4815  
 4820  
 4825  
 4830  
 4835  
 4840  
 4845  
 4850  
 4855  
 4860  
 4865  
 4870  
 4875  
 4880  
 4885  
 4890  
 4895  
 4900  
 4905  
 4910  
 4915  
 4920  
 4925  
 4930  
 4935  
 4940  
 4945  
 4950  
 4955  
 4960  
 4965  
 4970  
 4975  
 4980  
 4985  
 4990  
 4995  
 5000  
 5005  
 5010  
 5015  
 5020  
 5025  
 5030  
 5035  
 5040  
 5045  
 5050  
 5055  
 5060  
 5065  
 5070  
 5075  
 5080  
 5085  
 5090  
 5095  
 5100  
 5105  
 5110  
 5115  
 5120  
 5125  
 5130  
 5135  
 5140  
 5145  
 5150  
 5155  
 5160  
 5165  
 5170  
 5175  
 5180  
 5185  
 5190  
 5195  
 5200  
 5205  
 5210  
 5215  
 5220  
 5225  
 5230  
 5235  
 5240  
 5245  
 5250  
 5255  
 5260  
 5265  
 5270  
 5275  
 5280  
 5285  
 5290  
 5295  
 5300  
 5305  
 5310  
 5315  
 5320  
 5325  
 5330  
 5335  
 5340  
 5345  
 5350  
 5355  
 5360  
 5365  
 5370  
 5375  
 5380  
 5385  
 5390  
 5395  
 5400  
 5405  
 5410  
 5415  
 5420  
 5425  
 5430  
 5435  
 5440  
 5445  
 5450  
 5455  
 5460  
 5465  
 5470  
 5475  
 5480  
 5485  
 5490  
 5495  
 5500  
 5505  
 5510  
 5515  
 5520  
 5525  
 5530  
 5535  
 5540  
 5545  
 5550  
 5555  
 5560  
 5565  
 5570  
 5575  
 5580  
 5585  
 5590  
 5595  
 5600  
 5605  
 5610  
 5615  
 5620  
 5625  
 5630  
 5635  
 5640  
 5645  
 5650  
 5655  
 5660  
 5665  
 5670  
 5675  
 5680  
 5685  
 5690  
 5695  
 5700  
 5705  
 5710  
 5715  
 5720  
 5725  
 5730  
 5735  
 5740  
 5745  
 5750  
 5755  
 5760  
 5765  
 5770  
 5775  
 5780  
 5785  
 5790  
 5795  
 5800  
 5805  
 5810  
 5815  
 5820  
 5825  
 5830  
 5835  
 5840  
 5845  
 5850  
 5855  
 5860  
 5865  
 5870  
 5875  
 5880  
 5885  
 5890  
 5895  
 5900  
 5905  
 5910  
 5915  
 5920  
 5925  
 5930  
 5935  
 5940  
 5945  
 5950  
 5955  
 5960  
 5965  
 5970  
 5975  
 5980  
 5985  
 5990  
 5995  
 6000  
 6005  
 6010  
 6015  
 6020  
 6025  
 6030  
 6035  
 6040  
 6045  
 6050  
 6055  
 6060  
 6065  
 6070  
 6075  
 6080  
 6085  
 6090  
 6095  
 6100  
 6105  
 6110  
 6115  
 6120  
 6125  
 6130  
 6135  
 6140  
 6145  
 6150  
 6155  
 6160  
 6165  
 6170  
 6175  
 6180  
 6185  
 6190  
 6195  
 6200  
 6205  
 6210  
 6215  
 6220  
 6225  
 6230  
 6235  
 6240  
 6245  
 6250  
 6255  
 6260  
 6265  
 6270  
 6275  
 6280  
 6285  
 6290  
 6295  
 6300  
 6305  
 6310  
 6315  
 6320  
 6325  
 6330  
 6335  
 6340  
 6345  
 6350  
 6355  
 6360  
 6365  
 6370  
 6375  
 6380  
 6385  
 6390  
 6395  
 6400  
 6405  
 6410  
 6415  
 6420  
 6425  
 6430  
 6435  
 6440  
 6445  
 6450  
 6455  
 6460  
 6465  
 6470  
 6475  
 6480  
 6485  
 6490  
 6495  
 6500  
 6505  
 6510  
 6515  
 6520  
 6525  
 6530  
 6535  
 6540  
 6545  
 6550  
 6555  
 6560

Clin. Microbiol.), 34, p2933-2936 (1996)]。

上記(1)に記載の(a)乃至(d)のいずれかのオリゴヌクレオチドと対になって用いられるTaqManプローブの配列は、遺伝子多型を検出する対象となる遺伝子のヌクレオチド配列において、上記(1)に記載の(a)乃至(d)のいずれかの遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドと対になってPCRによって対象の遺伝子中の目的の配列を増幅できる限りにおいて特に制限されないが、具体的には相補鎖にあたる配列中の最も5'末端側の位置よりもさらに5'末端側領域に存在する配列中の連続した15~40ヌクレオチド、好ましくは18~35ヌクレオチド、更に好ましくは18~25ヌクレオチドの任意の部分配列からなる。ただし、遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチドとTaqManプローブに互いに相補的な配列が存在すると、お互いにアニーリングすることにより非特異的な配列が増幅され、特異的な遺伝子多型の検出の妨げとなるおそれがあるので、そのような組み合わせを避けたオリゴヌクレオチド及びTaqManプローブの設計を行うことが好ましい。

## 5. 遺伝子多型の検出方法

### A. PCRによる遺伝子多型の検出

#### (1) PCR

上記「4. オリゴヌクレオチドプライマー」の項の「(1) 遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド」の項目で設計した(a)乃至(d)のいずれかの遺伝子多型検出用のオリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとを用いたPCR反応を行うことにより、対象遺伝子の所定の位置の多型を検出することができる。ここでPCRは(i)「X-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(ii)「Y-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(iii)「N-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(iv)「P-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせ、(v)(i)と(ii)の組み合わせ、(vi)(iii)と(iv)の組み合わせのいずれかの組み合わせで行うことができる。

PCRの反応条件は所望の核酸配列を増幅できる限りにおいて特に制限されず、当業者が通常行う条件でPCRを行うことができるが、例えば、以下のようにして行うことができ

る。

(a) 核酸合成酵素

核酸合成酵素としては、鋳型の核酸の種類に応じて、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼおよび逆転写酵素(reverse transcriptase)から適宜選択して用いることができる。ここで、DNA ポリメラーゼとしては、例えば、*Thermus aquaticus* 由来の Taq DNA ポリメラーゼ、*Thermus thermophilus* 由来の Tth DNA ポリメラーゼ、*Pyrococcus* 由来の KOD、Pfu あるいは Pwo DNA ポリメラーゼ、あるいは前記の耐熱性ポリメラーゼの混合等があるが、これらにのみ限定されるものではない。なお Tth DNA ポリメラーゼは RT 活性も有しているため、RT-PCR を One tube-One stepで行うときに、1種類の酵素で賄うことが出来る特徴を有している。逆転写酵素は、RNA を cDNA に逆転写出来る酵素を意味する。逆転写酵素としては、Rous associated virus (RAV) や Avian myeloblastosis virus (AMV) 等のトリのレトロウイルス由来の逆転写酵素、Moloney murine leukemia virus (MMLV) 等のマウスのレトロウイルス由来の逆転写酵素あるいは前記の Tth DNA ポリメラーゼ等があるが、これらにのみ限定されるものではない。

(b) PCR 反応

PCR 反応は例えば、以下のとおりである。

反応液組成の例：

塩化マグネシウム 2乃至2.5mM (好ましくは2.5mM)；

1×PCR緩衝液(10mM トリス-塩酸(25℃におけるpH8.3乃至9.0 (好ましくは8.3))、50mM 塩化カリウム；

dNTPs 0.2乃至0.25mM (好ましくは0.25mM)；

遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド及び該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチド 0.2乃至0.5μM (好ましくは0.2μM)；

Taqポリメラーゼ 1乃至2.5単位 (好ましくは2.5単位)；

滅菌水を加えて全量を80μlに調整し、その全量を、逆転写反応を終了した反応液全量に加えてからPCRを開始する。

反応温度条件： まず94℃で2分間加熱した後、90乃至95℃ (好ましくは94℃) で30秒間、40乃至65℃ (好ましくは、プライマーの特性から算出される解離温度( $T_m$ ) からそれより20度低い温度までの範囲内で30秒間、70乃至75℃ (好ましくは72℃) で1.5分間の温度サイクルを28乃至50サイクル (好ましくは30サイクル)

繰り返してから、4℃に冷却する。

(2) 遺伝子多型の検出

PCR終了後、反応液を電気泳動し、目的配列の大きさのバンドが増幅されているか否かを検出する。

5 (a) 「X-PRIMER」を用いた場合

X-PRIMER及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、多型はないと判定することができる。

- 10 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

(b) 「Y-PRIMER」を用いた場合

- 15 Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

- 20 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

(c) 「X-PRIMER」及び「Y-PRIMER」の両方を用いた場合

- 25 X-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型はないと判定することができる。

- 30 一方、X-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有すると判定する



ことができる。

(d) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」及び該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、多型はないと判定することができる。

一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

10 (e) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

15 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

(f) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型はないと判定することができる。

一方、「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、「P-PRIMER」と該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有すると判定することができる。

上記(a)乃至(f)のいずれかと同様の実験をENAオリゴヌクレオチドを含まない、オリゴヌクレオチドで行うと本来バンドが出ないはずの鋳型となる核酸に対してもミスマ

ッチによるバンドの出現が確認され、本方法は従来の方法に比べ感度よく遺伝子多型を検出できることが確認できる。また、ENAユニットの代わりにLNAを用いた場合もミスマッチが確認されるが遺伝子多型の検出の精度は低下する。

また、ENAユニットの位置をオリゴヌクレオチドの3'末端から3番目以外にしたオリゴヌクレオチドを用いた場合には、遺伝子多型の検出の精度及び感度が低下する。

#### B. TaqMan PCRによる遺伝子多型の検出

上記、「A.」の項目において遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと上記「4.」の項目に記載のTaqManプローブを用い、ABI社ABI PRISM等を用い、その添付プロトコールに従ってTaqMan PCRを行うことによって遺伝子多型を検出することができる。

##### 10 (a) 「X-PRIMER」を用いた場合

「X-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるTaqMan PCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型はないと判定することができる。

15 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはX-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

##### (b) 「Y-PRIMER」を用いた場合

Y-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

25 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドはY-PRIMERの3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

##### (c) 「X-PRIMER」及び「Y-PRIMER」の両方を用いた場合

X-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認でき、Y-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

一方、X-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、Y-PRIMERとTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

5 (d) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるTaqMan PCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型はないと判定することができる。

- 10 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「N-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

(e) 「P-PRIMER」を用いた場合

- 15 「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドと判断することができ、遺伝子多型を有すると判定することができる。

- 一方目的の配列が増幅されないときは、多型部分のオリゴヌクレオチドは「P-PRIMER」の3'末端のオリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドではないと判断することができ、遺伝子多型を有しないと判定することができる。
- 20

(f) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

- 「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できない場合には、遺伝子多型を有しないと判定することができる。
- 25

一方、「N-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できず、「P-PRIMER」とTaqManプローブとの組み合わせによるPCRによって蛍光強度の増加によって目的とする配列の増幅が確認できた場合には、遺伝子多型を有しないと判定することができる。

- 30 C. MALDI-TOF/MS法による遺伝子多型の検出

MALDI-TOF/MS法による多型の検出法（「SNP遺伝子多型の戦略」（中村祐輔編），中山書店，東京，（2000）、p. 106-117）に記載の方法を一部改変することによって遺伝子多型を検出することができる。以下、具体的に説明する。

- 多型部位を含むPCR産物をゲノムDNAより増幅する。その際、多型部位の塩基とPCRプライマーは重複しないように設計する。

次にPCR反応系に残存しているdNTPとプライマーとして用いたオリゴヌクレオチドを除去し、精製PCR産物とする。

- 精製PCR産物を鋳型として、上記「4.」の「（1）遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチド」に記載のオリゴヌクレオチドを鋳型に対して10倍以上の過剰量加え、90乃至95℃でアニールさせ、サーマルサイクル反応を行う。サーマルサイクル反応はオリゴヌクレオチドの伸張反応が確認される限りにおいて特に制限されないが、例えば、94℃と37℃の2温度間で25回の反応で、適当な伸張効率が得られる。

得られた伸張反応産物を精製し、塩、緩衝液、界面活性剤、蛋白を除去する。この精製物をMALDIプレートにスポットし、MALDI-TOF/MSによって質量を分析する。

- 対象遺伝子の多型部位が遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドであるときには遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドにddNTPが付加された伸張反応産物の蓄積が確認されるが、多型部位が遺伝子多型検出用オリゴヌクレオチドと相補的でないときは伸張反応産物は蓄積されない。

- 「X-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は基準ヌクレオチドであり、多型を有しないと判定することができ、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は変異ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有すると判断できる。

「Y-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は変異ヌクレオチドであり、多型を有すると判断でき、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は基準ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有しないと判断できる。

- 「N-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は基準ヌクレオチドであり、多型を有しないと判定することができ、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は変異ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有すると判断できる。

- 「P-PRIMER」を用いた場合に伸張反応産物が確認されれば、多型部分は変異ヌクレオチドであり、多型を有すると判断でき、伸張反応産物が確認されなければ、多型部分は基準ヌクレオチドであり、遺伝子多型を有しないと判断できる。

また、キアゲン社 (Qiagen) の LightCycler system とそれを用いて PCR 産物を検出するキット (Quantitect SYBR Green PCR Kit) 等に応用することによって生成する PCR 産物の有無を検出することなどを用いて、PCR 産物を測定することも可能である。

5      6. 遺伝子多型の存在状態の確認

本発明の方法によると鋳型となる核酸中の多型がヘテロで存在するかホモで存在するかを判定することができる。具体的には以下の (a) 乃至 (f) のいずれかの方法によって判定することができる。

(a) 「X-PRIMER」を用いた場合

- 10      「X-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合にホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

(b) 「Y-PRIMER」を用いた場合

- 15      Y-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合にホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

(c) 「X-PRIMER」及び「Y-PRIMER」の両方を用いた場合

- 20      X-PRIMERと該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、Y-PRIMERと該ヌクレオチドと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによっても目的とする配列の増幅が確認できる場合には、多型はヘテロであると判定することができる。

- 25      (d) 「N-PRIMER」を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合に、ホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

- 30      (e) 「P-PRIMER」を用いた場合

「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認できた場合に、ホモであることが分かっている検体に比べ目的とするバンドの出現量が約半分になっている場合には、多型は基準ヌクレオチドと変異ヌクレオチドのヘテロであると判定することができる。

5 (f) 「N-PRIMER」及び「P-PRIMER」の両方を用いた場合

「N-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによって目的とする配列の増幅が確認でき、「P-PRIMER」と該プライマーと対になって用いられるオリゴヌクレオチドとの組み合わせによるPCRによっても目的とする配列の増幅が確認できる場合には、多型はヘテロであると判定することができる。

10

### 7. 遺伝子多型検出用キット

本発明の方法を行うために使用するプライマー及び試薬類を遺伝子多型検出用キットとして提供することができる。そのようなキットは以下の物を含む。

15 キット1：(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

20 (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液、

(13) 以下の物を含む、遺伝子多型検出用キット：

25 (a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-C-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

30 (b) (a)に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマ

一；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

キット2：

5 (a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

10 (b) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

15 (c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液。

キット3：

20 (a) 以下の(i)乃至(v)の特徴を有するオリゴヌクレオチド：

(i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

25

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

(iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-0,4'-G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

30 (v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにお

いて特に制限はないが、好ましくは15～40ヌクレオチド、より好ましくは18～35ヌクレオチド、更に好ましくは18～25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

5 (c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

キット4：

(a) 以下の特徴を有するオリゴヌクレオチド：

10 (i) オリゴヌクレオチドの3'末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる、

(ii) オリゴヌクレオチドの3'末端から2番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として2番目)のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる、

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する、

15 (iv) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-O-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる、

20 (v) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの長さはPCRによって核酸を増幅できる限りにおいて特に制限はないが、好ましくは15～40ヌクレオチド、より好ましくは18～35ヌクレオチド、更に好ましくは18～25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである。

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

25 本発明のこれらのキット1乃至4には、場合によっては電気泳動用の各種試薬、dNTP、電気泳動用マーカ等を含ませることもできる。

#### 図面の簡単な説明

図1は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がない場合を示す。

30 図2は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がある場合を示す。



図 3 は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がない場合を示す。

図 4 は遺伝子多型の検出方法の原理を示す図であり、多型がある場合を示す。

図 5 は Premix Taq を用いて各種プライマーを用いた P C R の結果を示す図である。

図 6 は Premix EX Taq を用いて各種プライマーを用いた P C R の結果を示す図である。

5 図 7 は P C R によって検出されたバンドの蛍光強度を数値化した図である。

図 8 はアンジオポエチン関連 3 遺伝子プロモーター内の多型を示す図である。

図 9 - A はマウス AKR strain 由来のゲノム DNA (AKR) を鋳型とした P C R の結果を示す図である。

10 図 9 - B は KK マウス Nga strain 由来のゲノム DNA (KK/Nga) を鋳型とした P C R の結果を示す図である。

図 1 0 は AKR のゲノム DNA、KK/Nga のゲノム DNA 、 KK マウス Snk strain (KK/Snk) のゲノム DNA、並びに、AKR と KK/Nga のゲノム DNA を等量ずつ混ぜた DNA を鋳型とした P C R の結果を示す図である。

図 1 1 はアンジオポエチン関連 3 遺伝子プロモーター内の多型を示す図である。

15 図 1 2 は Premix Taq を用いて各種プライマーを用いた P C R の結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例、参考例及び試験例にて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、下記実施例において、遺伝子操作に関する各操作は  
20 特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」 [Sambrook, J., Fritsch, E.F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊] に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

#### (実施例 1)

25 HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>i</sup> の合成

核酸自動合成機 (パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer) を用い、  
40 nmol のプログラムで行った。各合成サイクルにおける溶媒、試薬、ホスホロアミダイトの濃度は天然オリゴヌクレオチド合成の場合と同じものを用いた。CPG は、約 0.1 μmol  
用いた。非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 22 (5' -O-  
30 ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン

-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用いた。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相HPLC (島

- 5 津製作所製 LC-10VP、カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液: 5%アセトニトリル、0.1M 酢酸トリエチルアミン水溶液 (TEAA), pH 7.0、B 溶液: アセトニトリル、B%: 10%→50%(10min, linear gradient); 60°C; 2 ml/min; 254 nm) にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAA を除いた。80%酢酸水溶液 (200 μl) を加え、20 分放置することで、
- 10 ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち逆相HPLC (島津製作所製 LC-10VP、カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液: 5%アセトニトリル、0.1M TEAA, pH 7.0、B 溶液: 25%アセトニトリル、0.1M TEAA、B%: 0%→40%(10min, linear gradient); 60°C; 2 ml/min; 254 nm) にて精製し、目的物のピークを集めた。減圧下溶媒を留去後、水 1ml に溶かし、(9.4 A<sub>260</sub> units)。また、本化合物は、
- 15 負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値: 6214.11、測定値: 6214.62)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

#### (実施例 2)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>i</sup> の合成

- 20 実施例 2 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (21 A<sub>260</sub> units)。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値: 6229.12、測定値: 6229.21)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

- 25 (実施例 3)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>i</sup> の合成の合成

実施例 3 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.9 A<sub>260</sub> units)。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値: 8530.67、測定値: 8530.75)。

- 30 本化合物の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325 記載のヌクレオチド番号

60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

(実施例 4)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-5C<sup>e2p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>i</sup> の合成の合成

- 5 実施例 4 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (10.1 A<sub>260</sub> units)。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8515.66、測定値 : 8515.56)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

(参考例 1)

- 10 HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>i</sup>

参考例 1 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列であり、配列表の配列番号 1 に示されている。

- 15 (参考例 2)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>i</sup>

参考例 2 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

- 20 本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列であり、配列表の配列番号 2 に示されている。

(参考例 3)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>e2i</sup> の合成

- 25 参考例 3 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (0.3 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 5 (5' -O-ジメトキシトリチル -2' -O, 4' -C-エチレン-4-N-ベンゾイルシチジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用い、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6200.08、測定値 : 6200.25)。

- 30 本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No. M17262) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例 4)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>c21</sup> の合成

参考例 4 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (0.94 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -O-ジメトキシトリチル  
5 -2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用い、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6215.09、測定値 : 6215.06)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) の  
10 ヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

## (参考例 5)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>c2p</sup>-C<sup>i</sup> の合成

参考例 5 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (2.28 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホ  
15 スホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6200.08、測定値 : 6200.26)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) の  
20 ヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例 6)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>c2p</sup>-T<sup>i</sup> の合成

参考例 6 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (4.98 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホ  
25 スホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6215.09、測定値 : 6215.26)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262) の  
30 ヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

## (参考例 7)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>cp</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 7 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (4.32 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 27 (5' -O-ジメトキシトリチル  
5 -2' -O, 4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6200.08、測定値 : 6199.95)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262 ) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## 10 (参考例 8)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>cp</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>t</sup> の合成

参考例 8 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.0 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 27 (5' -O-ジメトキシトリチル  
15 -2' -O, 4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6215.09、測定値 : 6215.06)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262 ) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

## 20 (参考例 9)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>cp</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合成

参考例 9 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (13.28 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、文献 Tetrahedron (1998) 54, 3607-3630. 記載の 5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-メチレン-4-N-ペンゾイルシチジン-3' -O-(2-シアノエ  
25 チル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト、の化合物 (C<sup>cp</sup>) を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6186.05、測定値 : 6186.45)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262 ) のヌクレオチド番号 26784-26803 に相補的な配列である。

## (参考例 10)

30 HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>cp</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>t</sup> の合成

参考例 10 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した ( $8.0 A_{260}$  units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、文献 Tetrahedron (1998) 54, 3607-3630. 記載の 5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-メチレン-4-N-ベンゾイルシチジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト、の化合物 (C<sup>10</sup>) を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 6201.07、測定値 : 6201.14)。

本化合物の塩基配列は、human prothrombin gene (GenBank accession No.M17262 ) のヌクレオチド番号 26784-26803 であって、ヌクレオチド番号 26784 が G から A に変異したものに相補的な配列である。

(参考例 1 1)

10 HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>i</sup> の合成  
参考例 1 1 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列であり、配列表の配列番号 3 に示されている。

15 (参考例 1 2)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>i</sup> の合成  
参考例 1 2 の化合物は、核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であり、配列表の配列番号 4 に示されている。

20 (参考例 1 3)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>c21</sup> の合成

参考例 1 3 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した ( $7.8 A_{260}$  units)。但し、非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 9 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-5-メチルウリジン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト) の化合物を用い、固相担体は、universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1  $\mu$ mol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8516.64、測定値 : 8515.88)。

30 本化合物の塩基配列は、GenBank accession No.AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

## (参考例 1 4)

HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-5C<sup>e21</sup> の合成

参考例 1 4 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (7.4 A<sub>260</sub> units)。但し、固相担体は、  
5 universal-Q 500 CPG (Glen Research 製) 約 0.1 μmol を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定した (計算値 : 8516.66、測定値 : 8516.00)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

## (参考例 1 5)

10 HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>e2p</sup>-T<sup>l</sup> の合成

参考例 1 5 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (8.4 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型の  
ホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -O-ジメトキシトリチル  
-2' -O, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソ  
15 プロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析に  
より同定した (計算値 : 8516.64、測定値 : 8516.32)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

## (参考例 1 6)

20 HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>e2p</sup>-C<sup>l</sup> の合成

参考例 1 6 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した (7.9 A<sub>260</sub> units)。但し、非天然型の  
ホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -O-ジメトキシトリチル  
-2' -O, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソ  
25 プロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析に  
より同定した (計算値 : 8501.63、測定値 : 8500.70)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60529-60556 の配列である。

## (参考例 1 7)

30 HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>e2p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>l</sup> の合

成

参考例 17 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した ( $9.7 A_{260}$  units)。但し、非天然型の  
 ホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -O-ジメトキシトリチル  
 -2' -O, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソ  
 5 プロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析に  
 より同定した (計算値 : 8516.64、測定値 : 8517.14)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号  
 60529-60556 の配列であって、ヌクレオチド番号 60556 の C が T になっている配列である。

(参考例 18)

10 HO-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>e2p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>t</sup> の合  
 成

参考例 18 の化合物は、実施例 1 と同様に合成した ( $7.2 A_{260}$  units)。但し、非天然型の  
 ホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 14 (5' -O-ジメトキシトリチル  
 -2' -O, 4' -C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソ  
 15 プロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。本化合物は、負イオン ESI 質量分析に  
 より同定した (計算値 : 8501.63、測定値 : 8501.65)。

本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号  
 60529-60556 の配列である。

(試験例 1) Human prothrombin gene の SNP の検出

20 human prothrombin gene (coagulation factor II), GenBank accession No. M17262)  
 の SNP (F2 20210G-A) の検出のために、Reverse primer, Human DNA は、Prologo 社の TrueSNP  
 Demo Kit を同プロトコールに従って調製したものを使用した。Reverse primer のヌクレ  
 オチド配列は GenBank accession No. M17262 ) のヌクレオチド番号 26588-266  
 05 に相当し、以下のとおりである。

25 5' -GGGTGAAGGCTGTGACCG-3' (配列表の配列番号 5)

Forward primer として実施例 1、実施例 2、参考例 1、参考例 2、参考例 3、参考例 4、  
 参考例 5、参考例 6、参考例 7 及び参考例 8 のいずれかに記載の化合物 (1.25  $\mu$ M) 5  $\mu$ L、  
 Reverse primer 1.3  $\mu$ L、Premix Taq (宝酒造製) 12.5  $\mu$ L、Human DNA 溶液 1  $\mu$ L、滅菌水  
 5.2  $\mu$ L を含む溶液を Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240) を使って、PCR 反応  
 30 (Hot Start 法) を行った。反応サイクルは、94°C 10 分間の処理の後、94°C 1 分、63°C 1



分、72℃ 1 分、の反応を31 サイクル繰り返した。反応後、反応液 5  $\mu$ L に 1  $\mu$ L の loading solution を加え、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1xTBE, 200V 定電圧, 約1 時間) を行い、SYBR Green I (Cambrex 社製) で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad) を用いバンドを可視化し、Quantity One software (Bio-Rad) を使って定

5 量した。

その結果を図 5 に示す。ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した化合物を Forward primer に用いた場合では、実施例 1 に記載の化合物では目的の遺伝子 (216 bp) の増幅が確認できたのに対し、実施例 2 に記載の化合物では目的の遺伝子 (216 bp) の増幅が確認できなかった。一方、天然型のオリゴヌクレオチドである参考例 1 及び参考例 2 に記載の

10 化合物を Forward primer に用いた場合では、参考例 1 に記載の化合物だけではなく、参考例 2 に記載の化合物でも遺伝子の増幅が確認され、ミスマッチによる遺伝子の増幅が起きていた。また、ENA ユニットを 3' 末端に導入した参考例 3 及び 4 の化合物、並びに、ENA ユニットを 3' 末端から 2 番目に導入した参考例 5 及び 6 の化合物では目的のバンドの増幅は確認できなかった。このことから ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した化合物

15 物をプライマーに用いるとミスマッチがほとんどなく選択的な遺伝子 (216 bp) の増幅ができることがわかった。

また、図 6 においては、Premix Taq (宝酒造製) のかわりに、Premix EX Taq (宝酒造製) を用いた例を示す。この場合においても、ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入したプライマーにおいてミスマッチがほとんど起こらず、実施例 1 のプライマーを用いたものが、

20 最も効率的に、かつ、選択的に遺伝子が増幅された。

検出されたバンドの蛍光強度を数値化し、図 7 のようにプロットした。参考例 9、10 に記載の化合物は、LNA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した場合であり、参考例 10 の化合物を Forward primer に用いた場合、ミスマッチによる遺伝子の増幅が 15% 見られたのに対し、ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した、実施例 2 の化合物を Forward primer

25 に用いた場合では、ミスマッチによる遺伝子の増幅が 6% に過ぎず、ENA 体がミスマッチが少なく選択性が高いことが明らかになった。

(試験例 2) アンジオポエチン関連 3 (Angiopoietin-like 3) 遺伝子プロモーター内の多型の検出

(1) マウスゲノム DNA の調製

30 マウス AKR strain、KK マウス Nga strain 及び KK マウス Snk strain のマウス (4 週齢)

- より採取した尾 (1.5 cm) を 840  $\mu$ l の溶解液 (720  $\mu$ l の 1 $\times$ SSC、80  $\mu$ l の 10% SDS、40  $\mu$ l の 10mg/ml プロテイナーゼ K を含む) に浸漬し、50 $^{\circ}$ C で保温しながら一晩振盪した。次いで、1mg/ml リボヌクレアーゼ A を 20  $\mu$ l 加えて、50 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を 2 回、
- 5 エタノール沈殿操作を 1 回行い、沈殿を 10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1mM EDTA を含む緩衝液 150  $\mu$ l に溶解した。溶液を分光光度計 (U-3000、(株) 日立製作所製) で 260 nm 波長における吸光度を測定し、滅菌水を加えて濃度を 25 ng/ $\mu$ l に調整してゲノム DNA 試料とした。

## (2) PCR

- 10 Angiopoietin-like protein 3 遺伝子プロモーター内の多型は、direct sequence の結果から、図 8 のような多型を持つ。図 8 では、マウス KK/Nga strain、KK/Snk strain と比べてマウス AKR strain では「:」で示す 2 塩基 (CA) が欠失している多型を有することを示している。

PCR における Reverse primer は以下の配列:

- 15 5' -GTCAGTACTACTGCTTACTGTCC-3' (配列表の配列番号 6)

- (本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60658-60682 に相補的な配列である) のものを用いた。Forward primer として実施例 3、実施例 4、参考例 11、参考例 12、参考例 13、参考例 14、参考例 15、参考例 16、参考例 17 及び参考例 18 のいずれかに記載の化合物 (1.25  $\mu$ M) 5  $\mu$ L、Reverse primer (1.25  $\mu$ M) 5
- 20  $\mu$ L、Premix Taq (宝酒造製) 12.5  $\mu$ L、ゲノム DNA 溶液 (100 ng/1  $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L、滅菌水 2.38  $\mu$ L の溶液を、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240) を使って、PCR 反応 (Hot Start 法) を行った。反応サイクルは、94 $^{\circ}$ C 10 分間の熱処理後、94 $^{\circ}$ C 分、63 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 30 サイクル繰り返した。反応後、反応液 5  $\mu$ L に 1  $\mu$ L の loading solution を加え、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (1 $\times$ TBE, 200V 定電圧, 約 1 時間)
- 25 を行い、SYBR Green I (Cambrex 社製) で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad) を用い可視化した。

## (3) 結果

- マウス AKR strain 由来のゲノム DNA (AKR) を鋳型として用いた結果を図 9-A に示す。ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した実施例 3 及び 4 に記載の化合物において、
- 30 実施例 3 の化合物を forward primer に用いたものが、選択的に遺伝子 (152 bp) を増幅でき

ることがわかった。

KK マウス Nga strain 由来のゲノム DNA (KK/Nga) を鋳型に用いた場合を図 9-B に示す。ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した実施例 3 及び 4 に記載の化合物において、実施例 4 に記載の化合物を Forward primer に用いたものが、最も効率的に、かつ、選択的に

5 遺伝子 (154bp) を増幅できることがわかった。

図 10 に、実施例 3 及び 4 に記載の化合物のいずれかを Forward primer として用い、AKR のゲノム DNA、KK/Nga のゲノム DNA、KK マウス Snk strain (KK/Snk) のゲノム DNA、並びに、AKR と KK/Nga のゲノム DNA を等量ずつ混ぜた DNA (Mix) を鋳型とした PCR の結果を示した。図 10 A に示したように、AKR では実施例 3 に記載の化合物を Forward

10 primer として用いたもので選択的な遺伝子の増幅が確認され、また KK/Nga、KK/Snk では実施例 4 に記載の化合物を Forward primer として用いたもので選択的な遺伝子の増幅が確認された。Mix では、実施例 3 及び 4 に記載のいずれの化合物を Forward primer として用いた場合にも遺伝子の増幅が確認され、多型がヘテロである場合でも、見分けがつくことが示された。また、図 10 B に示したように、すべてが天然型 DNA プライマーである参考

15 例 11 及び 12 に記載の化合物を Forward primer として用いた場合、目的のバンドの増幅以外に副生成物が見られ、ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入した実施例 3 及び 4 に記載の化合物の組み合わせの方が遺伝子多型検出に優れていることがわかった。

(実施例 5)  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{e2p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{t}}$  の合成

20 核酸自動合成機 (パーキンエルマー社製 ABI model 394 DNA/RNA synthesizer) を用い、40 nmol のプログラムで  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{e2p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{t}}$  を合成した (以下、「プライマー A」とする。各合成サイクルにおける溶媒、試薬、ホスホロアミダイトの濃度は天然オリゴヌクレオチド合成の場合と同じものを用いた。CPG は、約  $0.1 \mu\text{mol}$  用いた。非天然型のホスホロアミダイトとしては、特許第 3420984 号の実施例 27 (5' -O-ジメトキシトリチル-2' -O, 4' -C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3' -O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル) ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基

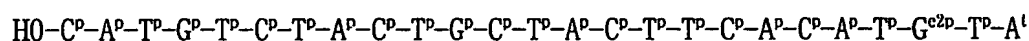
25

30 をはずした。溶媒を減圧下留去し、残った残渣を逆相 HPLC (島津製作所製 LC-10VP、

カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液: 5%アセトニトリル、0.1M 酢酸トリエチルアミン水溶液 (TEAA), pH 7.0、B 溶液: アセトニトリル、B%: 10%→50%(10min, linear gradient); 60℃; 2 ml/min; 254 nm) にて精製し、ジメトキシトリチル基を有する目的物のピークを集めた。水を加え、減圧下留去することで、TEAA  
 5 を除いた。80%酢酸水溶液 (200 μl) を加え、20 分放置することで、ジメトキシトリチル基の脱保護を行った。溶媒を留去したのち逆相 HPLC (島津製作所製 LC-10VP、カラム (Merck, Chromolith Performance RP-18e (4.6×100mm))、A 溶液: 5%アセトニトリル、0.1M TEAA, pH 7.0、B 溶液: 25%アセトニトリル、0.1M TEAA、B%: 0%→40%(10min, linear gradient); 60℃; 2 ml/min; 254 nm) にて精製し、目的物のピークを集めた。減圧下溶媒  
 10 を留去後、水 1ml に溶かし、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値: 7625.0、測定値: 7624.1)。

本化合物 (プライマー A) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が T であって、ヌクレオチド番号 60523 の A が G になっている配列である。

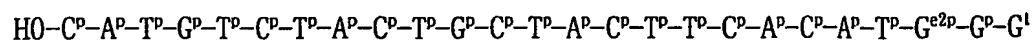
15 (実施例 6) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>t</sup> の合成



(以下「プライマー B」とする。) を、実施例 5 と同様の方法で合成し、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値: 7609.0、測定値: 7609.2)。

20 本化合物 (プライマー B) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が T になっている配列である。

(実施例 7) HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>e2p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>t</sup> の合成



25 (以下、「プライマー C」とする。) を、実施例 1 と同様の方法で合成し、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値: 7650.0、測定値: 7649.4)。

本化合物 (プライマー C) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が G であって、  
 30 ヌクレオチド番号 60523 の A が G になっている配列である。

(実施例 8)  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{c2p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{t}}$   
 の合成

5  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{c2p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{t}}$  (以下、「プライマーD」とする。)を、実施例 5 と同様の方法により合成し、MALDI-TOF 質量分析により同定した (計算値: 7634.1、測定値: 7634.2)。

本化合物 (プライマーD) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が G になっている配列である。

10 (参考例 19)  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{t}}$   
 の合成

$\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{t}}$   
 (以下、「プライマーE」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。本化合物 (プライマーE) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が T であって、ヌクレオチド番号 60523 の A が G になっている配列であり、配列表の配列番号 7 に示されている。

(参考例 20)

$\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{t}}$  の合成

20  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{t}}$  (以下、「プライマーF」とする。)を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。本化合物 (プライマーF) の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が T になっている配列であり、配列表の配列番号 8 に示されている。

25 (参考例 21)  $\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{t}}$   
 の合成

$\text{HO}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{C}^{\text{p}}-\text{A}^{\text{p}}-\text{T}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{p}}-\text{G}^{\text{t}}$  本 (以下、「プライマーG」とする。)は核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

プライマーGの塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が G であって、ヌクレオチド番号 60523 の A が G になっている配列であり、配列表の配列番号 9 に示されている。

## (参考例 2 2)

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup>

の合成

HO-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-T<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-G<sup>p</sup>-A<sup>t</sup> 本 (以下、「プライマーH」とする。) を核酸自動合成機を用いて常法により合成した。

プライマーHの塩基配列は、GenBank accession No. AL935325.14 記載のヌクレオチド番号 60499-60523 の配列であって、ヌクレオチド番号 60522 の C が G になっている配列であり、配列表の配列番号 10 に示されている。

(試験例 3) アンジオポエチン関連 3 (Angiopoietin-like 3) 遺伝子プロモーター内の SNP の検出

マウス AKR 系統 (strain) 及び KK マウス Nga 系統 (strain) 由来マウス (4 週齢) より採取した尾 (1.5 cm) を 840  $\mu$ l の溶解液 (720  $\mu$ l の 1 $\times$ SSC、80  $\mu$ l の 10% SDS、40  $\mu$ l の 10mg/ml プロテイナーゼ K を含む) に浸漬し、50 $^{\circ}$ C で保温しながら一晩振盪した。次いで、1mg/ml リボヌクレアーゼ A を 20  $\mu$ l 加えて、50 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を 2 回、エタノール沈殿操作を 1 回行い、沈殿を 10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1mM EDTA を含む緩衝液 150  $\mu$ l に溶解した。その後、分光光度計 (U-3000、(株)日立製作所製) で 260 nm 波長における吸光度を測定し、滅菌水を加えて濃度を 25 ng/ $\mu$ l に調整してゲノム DNA 試料とした。

Angiopoietin-like 3 遺伝子プロモーター内の SNP は、direct sequence の結果から、図 11 のような SNP を持つ。

リバース・プライマー (Reverse primer) のヌクレオチド配列は：

5' -GTCAGTACTACTGCTTACTGTCC-3' (配列表の配列番号 6)、

(本化合物の塩基配列は、GenBank accession No. AL935325 記載のヌクレオチド番号 60658-60682 に相補的な配列である。) である。

Premix Taq (宝酒造製) 12.5  $\mu$ L、ゲノム DNA 溶液 (100 ng/1  $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L、リバース・プライマー (1.25  $\mu$ M) 5  $\mu$ L、滅菌水 2.38  $\mu$ L、フォワード・プライマー (forward primer) として実施例または、参考例に記載の化合物 (プライマー A、プライマー B、プライマー C、プライマー D、プライマー E、プライマー F、プライマー G 及びプライマー H) (1.25  $\mu$ M) を 5  $\mu$ L になるように調製し、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL (TP240) を使っ

て、PCR 反応 (Hot Start 法) を行った。反応サイクルは、94℃、10 分後、94℃ 1 分、63℃ 1 分、72℃ 1 分、これを 30 サイクル繰り返した。

反応後、反応液 5  $\mu$ L に 1  $\mu$ L の添加液 (loading solution) を加え、10%ポリアクリル  
アミドゲル電気泳動 (1xTBE, 200V 定電圧, 約 1 時間) を行い、SYBR Green I (Cambrex  
5 社製) で染色後、Molecular Imager FX Fluorescent Imager system (Bio-Rad) を用い可視化  
した。

PCR 反応が正確に行われた場合、マウス AKR 系統 (strain) 由来のゲノム DNA (AKR)  
を用いた場合、選択的に遺伝子 (182 bp) が増幅され、KK マウス Nga 系統 (strain) 由来  
のゲノム DNA (KK/Nga) を用いた場合、選択的に遺伝子 (184 bp) が増幅されると予想さ  
10 れた。

結果を図 1 2 に示す。プライマー E 又はプライマー F をフォワード・プライマーとして  
PCR を行ったところ、マウス AKR 系統由来のゲノム DNA では、プライマー E をプライ  
マーとして用いた場合に遺伝子の増幅が確認された。一方、KK マウス Nga 系統由来のゲノ  
ム DNA においては、プライマー F をプライマーとして用いた場合及びプライマー E をプ  
15 ライマーとして用いた場合の両方で遺伝子の増幅が観察された。

またプライマー A 又はプライマー B をプライマーとして PCR を行ったところ、マウス  
AKR 系統由来のゲノム DNA では、プライマー A をプライマーとして用いた場合に遺伝子  
が増幅され、KK マウス Nga 系統由来のゲノム DNA においては、プライマー B をプライ  
マーとして用いた場合に遺伝子の増幅が観察された。

20 プライマー G 又はプライマー H をプライマーとして用いた場合、マウス AKR 系統由来の  
ゲノム DNA では、プライマー G をプライマーとして用いた場合に目的の遺伝子産物が増  
幅されたが、プライマー H をプライマーとした場合には、目的の大きさより小さい副生成  
物と考えられる増幅産物が得られた。また、KK マウス Nga 系統由来のゲノム DNA におい  
ては、プライマー H をプライマーとした場合には、目的の遺伝子産物だけでなく、目的よ  
25 りも小さい鎖長を持つ副生成物と考えられる増幅産物が得られた。

プライマー C 又はプライマー D をプライマーとして用いた場合、マウス AKR 系統由来の  
ゲノム DNA では、プライマー C をプライマーとして用いた場合に遺伝子が増幅され、さ  
らに、KK マウス Nga 系統由来のゲノム DNA においては、プライマー D をプライマーとし  
て用いた場合に遺伝子の増幅が観察された。

30 以上のことから ENA ユニットを 3' 末端から 3 番目に導入したプライマーを用いること

により、ENAユニットを導入していない、従来のプライマーと比べて検出効率が向上することが確認できた。

#### 産業上の利用可能性

- 5 本発明の方法により、遺伝子多型の検出が可能となる。また、本発明の遺伝子多型の検出方法を用いることにより、天然型のオリゴヌクレオチドを用いる場合に比べより正確に多型を検出できるようになる。

- また、該方法に用いることができる、遺伝子多型の検出用オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを含有する遺伝子多型の検出用キットによって、種々の遺伝子多型を検出
- 10 できる。本発明は、医療、農業、食品、工業等の種々の産業に利用することができるが、遺伝子多型の検出を必要とする限りにおいて産業分野は制限されない。



## 請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 及び (b) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
  - (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' - $\epsilon$ -エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；
  - (b) 3' 末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する。
2. 以下の (a) 及び (b) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
  - (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目のヌクレオチドが 2' -0,4' - $\epsilon$ -エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；
  - (b) 3' 末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有する。
3. 以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
  - (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；
  - (b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；
  - (c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；
  - (d) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' - $\epsilon$ -エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。
4. 以下の (a) 乃至 (d) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：
  - (a) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；
  - (b) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

- (c) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；
- (d) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目(3'末端のヌクレオチドを1番目として3番目)のヌクレオチドが2'-O,4'-G-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

- 5 5. 18乃至25塩基長からなることを特徴とする、請求項1乃至4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩。
6. 請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型の検出方法。
7. 請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法。
- 10 8. 以下の工程(a)及び(b)を含む、遺伝子多型の検出方法：
- (a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行う工程；
- 15 (b) 工程(a)によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型の有無を判定する工程。
9. 以下の工程(a)及び(b)を含む、遺伝子多型部位のヌクレオチド配列の決定方法：
- (a) 遺伝子多型部位を含む核酸を鋳型として、請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、及び該オリゴヌクレオチドと対になってPCRで目的配列部分を増幅できるオリゴヌクレオチドを用いてPCRを行う工程；
- 20 (b) 工程(a)によって反応産物が生成するか否かによって、核酸中の遺伝子多型部位のヌクレオチド配列を決定する工程。
10. 反応産物の生成の有無の検出に、電気泳動、TaqMan PCR及びMALDI-TOF/MS法からなる群から選択される少なくともいずれか一つを用いることを特徴とする請求項8又は9に記載の方法。
- 25 11. 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、請求項6乃至10のいずれか1項に記載の方法。
12. 以下の(a)乃至(d)を含む、遺伝子多型検出用キット：
- (a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-O,4'-G-エチレンヌクレオチド(ENA)ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチド

からなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

1 3. 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-*C*-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るプライマー；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

1 4. 以下の (a) 乃至 (e) を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-*C*-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(b) オリゴヌクレオチドの3'末端から3番目のヌクレオチドが2'-0,4'-*C*-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなり、3'末端部位に対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチド、その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド；

(c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液。

15. 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩：

5 (i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

10 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' - $\epsilon$ -エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

15 (b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

16. 以下の (a) 乃至 (d) を含む、遺伝子多型検出用キット：

20 (a) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

(ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

25 (iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

(iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -0,4' - $\epsilon$ -エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

30

(b) (a) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

(c) DNAポリメラーゼ；

(d) PCR緩衝液。

5 17. 以下の (a) 乃至 (e) を含む、遺伝子多型検出用キット：

(a) 以下の (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の基準ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

10 (ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

15 (iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる；

(b) (i) 乃至 (iv) の特徴を有するオリゴヌクレオチド又はその塩；

(i) オリゴヌクレオチドの 3' 末端部位が対象遺伝子の変異ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドからなる；

20 (ii) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 2 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 2 番目) のヌクレオチドが基準遺伝子のヌクレオチドと相補的でないヌクレオチドからなる；

(iii) その他の部位には対象遺伝子のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを有する；

25 (iv) オリゴヌクレオチドの 3' 末端から 3 番目 (3' 末端のヌクレオチドを 1 番目として 3 番目) のヌクレオチドが 2' -O, 4' -G-エチレンヌクレオチド (ENA) ユニットからなり、他のヌクレオチドは天然型のヌクレオチドからなる。

(c) (a) 又は (b) に記載のオリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチド；

30 (d) DNAポリメラーゼ；

(e) PCR緩衝液。

18. オリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドと対になって目的配列部分を増幅し得るオリゴヌクレオチドの塩基長が18乃至25塩基長であることを特徴とする、請求項12乃至17のいずれか1項に記載の遺伝子多型検出用キット。
- 5 19. 遺伝子多型が一塩基多型であることを特徴とする、請求項12乃至18のいずれか1項に記載のキット。

図1

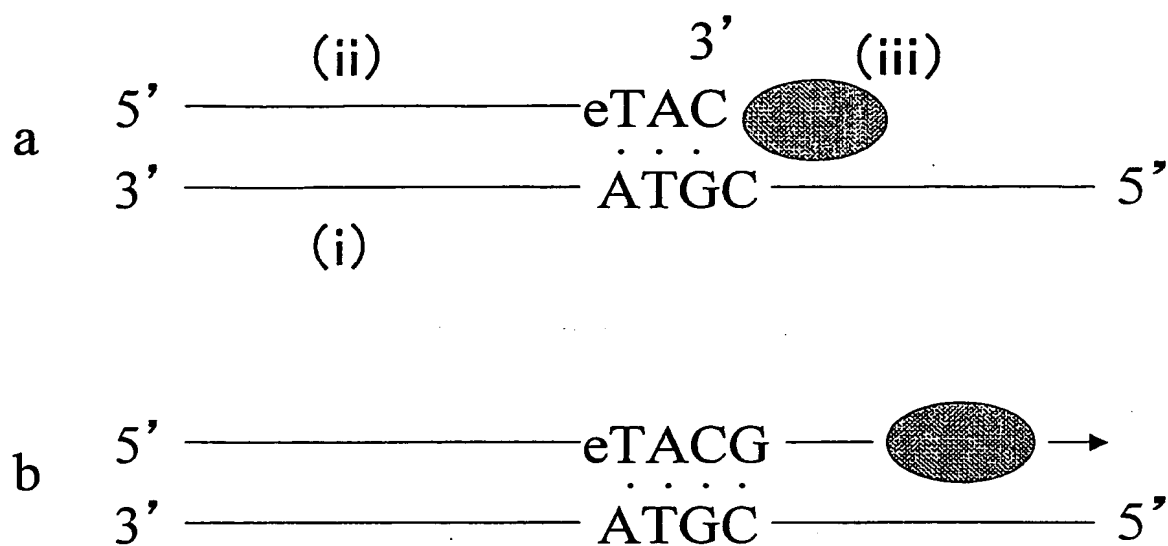


図2

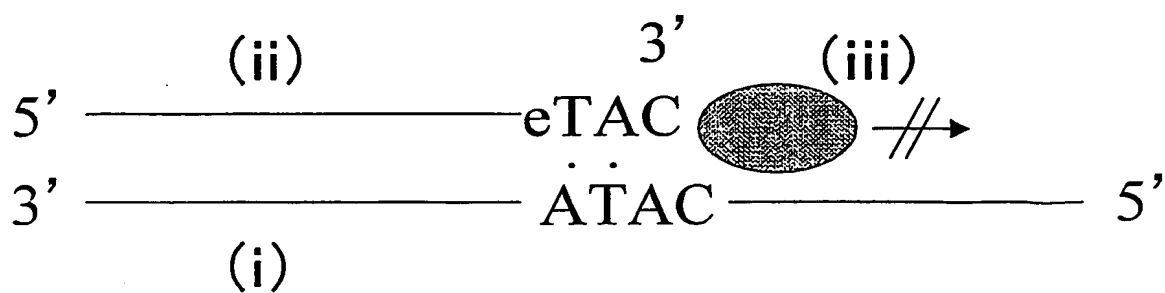


図3

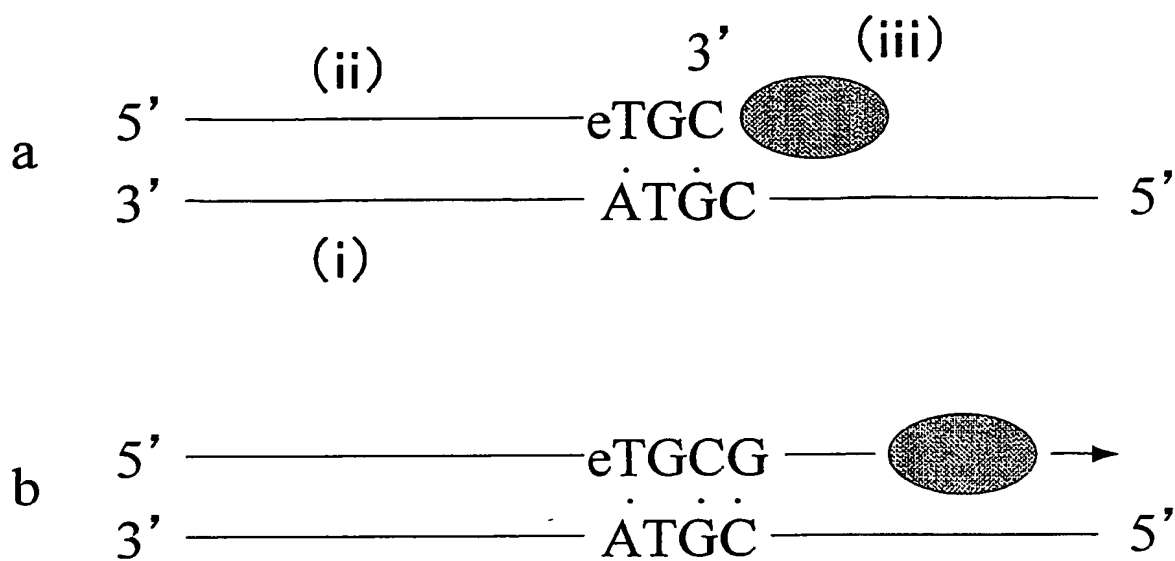


図4

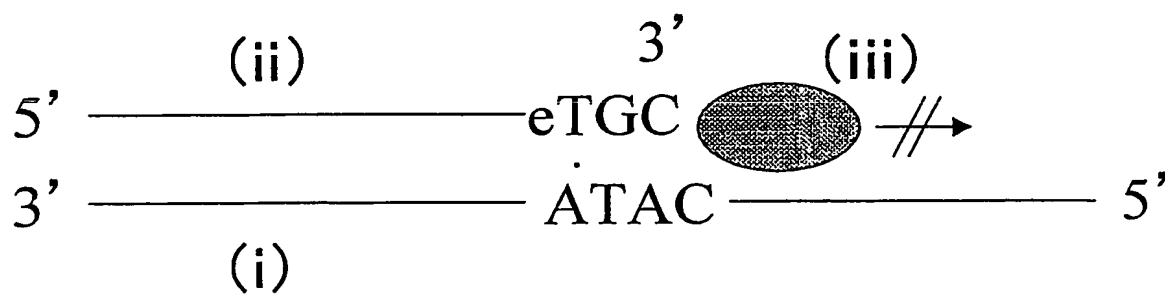




図5

参考例1 参考例2 参考例3 参考例4 参考例5 参考例6 実施例1 実施例2 参考例7 参考例8

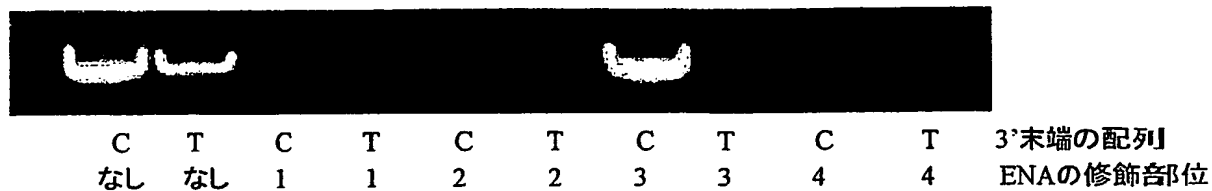
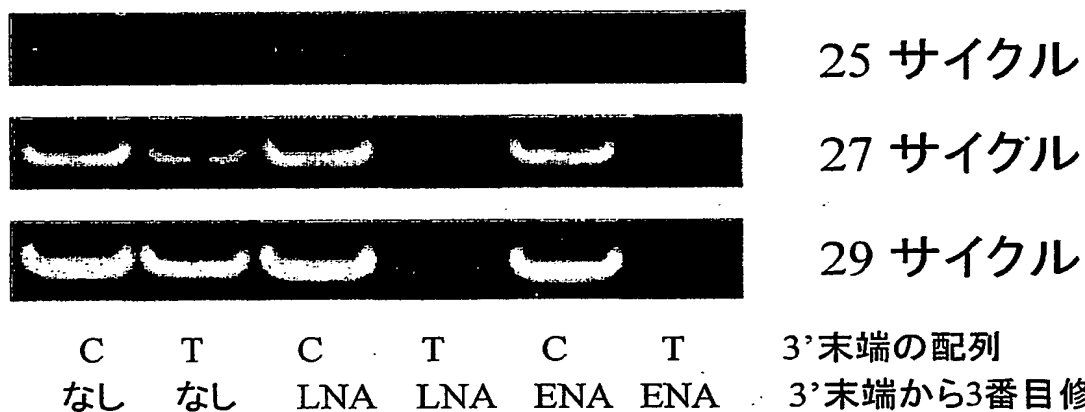


図6

参考例1 参考例2 参考例9 参考例10 実施例1 実施例2



BEST AVAILABLE COPY

図7

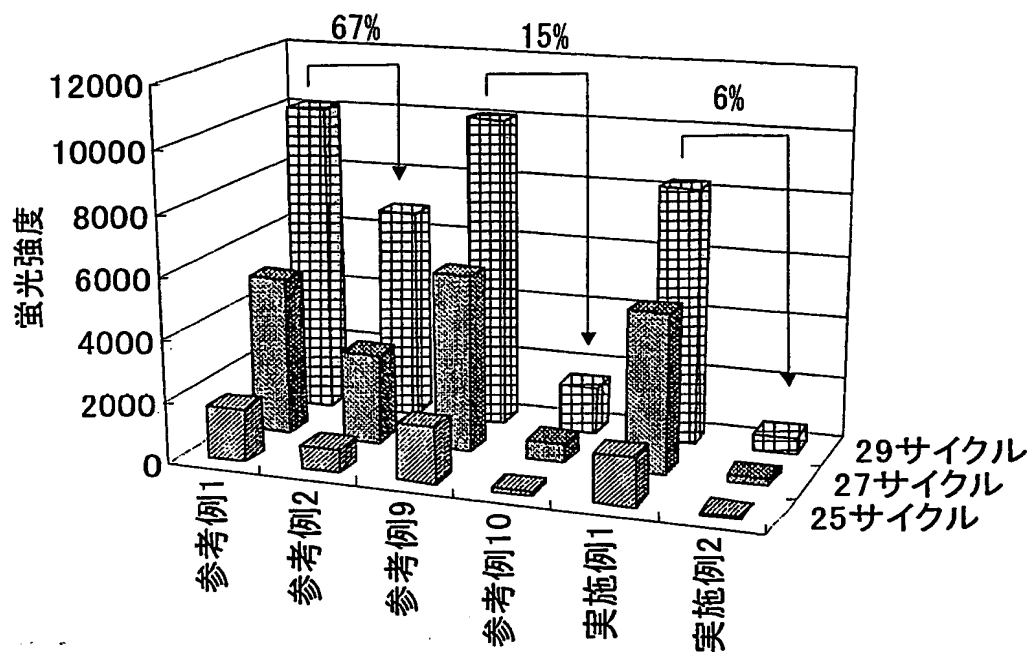


図8

(KK/Nga, KK/Snk)  
(AKR)

ACAT

---ATCTGTCTACATATATATACACACACA::T---

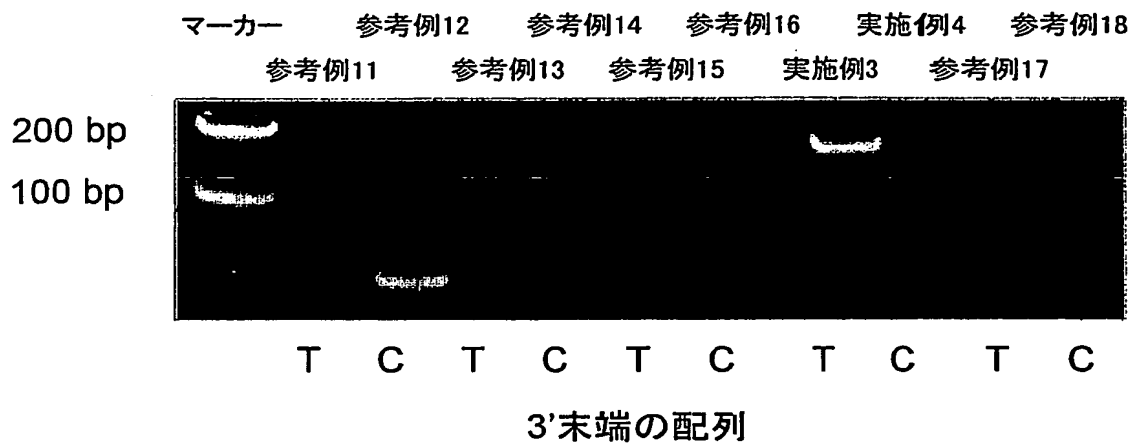
Primer

5' ATCTGTCTACATATATATACACACACAT3'

5' ATCTGTCTACATATATATACACACACAC3'

## 図9

A



B

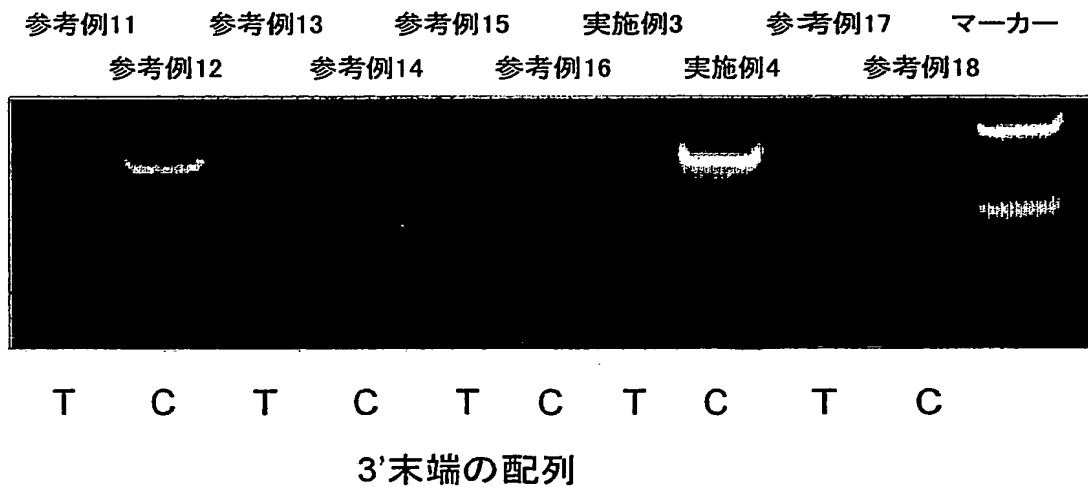


図10

A



B

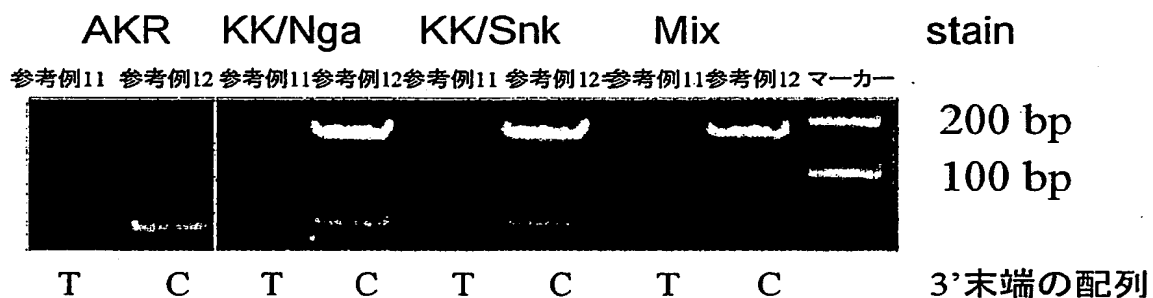


図11

(KK/Nga)

A

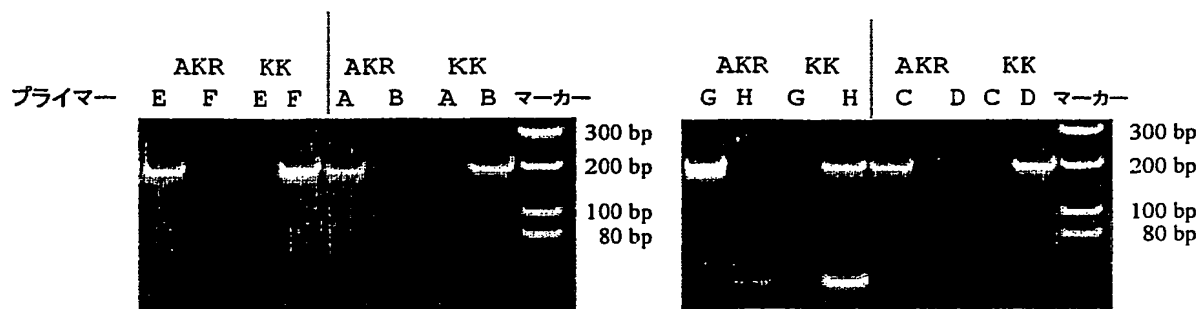
(AKR)

--CATGTCTACTGCTACTTCACATGCG---

Primer

5' CATGTCTACTGCTACTTCACATGKG3'5' CATGTCTACTGCTACTTCACATGKA3'K=G/T, G=ENA

図12



International Patent Class. 2006

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; SANKYO COMPANY, LIMITED

&lt;120&gt; Method for identifying SNPs

&lt;130&gt; 2004073SU

&lt;150&gt; JP 2003-378039

&lt;151&gt; 2003-11-07

&lt;150&gt; JP 2004-121080

&lt;151&gt; 2004-04-16

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Inventor: Koizumi, Makoto

&lt;400&gt; 1

cactgggagc attgaggctc

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<221> allele  
<222> (20)..(20)  
<223>

<220>  
<221> allele  
<222> (20)..(20)  
<223> C is transited to T

<400> 2  
cactgggagc attgaggctt 20

<210> 3  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> allele  
<222> (28)..(28)  
<223> C is transitioned to T

<400> 3  
atctgtctac atatatatac acacacat 28

<210> 4  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 4  
atctgtctac atatatatac acacacac 28

<210> 5  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
gggtgaaggc tgtgaccg

18

<210> 6  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 6  
gtcactagac tactgcttac tgtcc

25

<210> 7  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primerE

<400> 7  
catgtctact gctactcac atgtg

25

<210> 8  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial



<220>

<223> primer F

<400> 8

catgtctact gctacttcac atgta

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer G

<400> 9

catgtctact gctacttcac atggg

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer H

<400> 10

catgtctact gctacttcac atgga

25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOIZUMI, M. et al., Triplex formation with 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) having C3'-endo conformation at physiological pH, Nucleic Acids Res. (2003 June), Vol.31, No.12, pages 3267 to 3273	1-19
A	MORITA, K. et al., 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorg.Med.Chem.Lett. (2002), Vol.12, No.1, pages 73 to 76	1-19
A	Masafumi MATSUO et al., Kosei Rodosho Seishin Shinkei Shikkan Kenkyu Itakuhi ni yoru Kenkyu Hokokushu, Heisei 14 Nendo (2003 July), page 590	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 January, 2005 (17.01.05)

Date of mailing of the international search report  
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12Q1/68, C07H21/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KOIZUMI M. et al., Triplex formation with 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) having C3'-endo conformation at physiological pH, Nucleic Acids Res. (2003-Jun), Vol. 31, No. 12, p. 3267-3273	1-19
A	MORITA K. et al. 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorg. Med. Chem. Lett. (2002), Vol. 12, No. 1, p. 73-76	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 02. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	松尾雅文 他, 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費による研究 報告集 平成14年度 (2003-Jul), p. 590	1 - 19

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**